

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Búsqueda de altos niveles de resistencia a la marchitez
bacteriana en especies silvestres de papa**

TESIS

para optar al título profesional de Biólogo con Mención en Biología Celular
y Genética

AUTORA

María Elena Vargas Mogollón

Lima – Perú

2010

*A Dios, el camino y la luz que guía mi vida;
por ser mi fortaleza diaria de ayer,
hoy y siempre; por darme la vida
y regalarme una familia maravillosa.*

*A mis padres, por su apoyo, confianza y amor. A mi madre por
hacer de mi una mejor persona a traves de sus consejos,
enseñanzas y aliento, por ser mi ejemplo de vida.
Gracias viejitos por su apoyo incondicional
y por haber creído en mí;
Yo se que ambos desde arriba, siempre me
acompañaran en cada paso de mi vida.*

*A mi esposo Carlos, por ser mi compañero y amigo,
por su paciencia, por su comprensión, por
su empeño, por su fuerza, por su amor,
por ser tal y como es.*

*A mis hijos Fabrizio y María Jose,
los regalos más maravillosos que la vida me dio;
ustedes llegaron a completar mi vida;
sin duda son mi referencia para el
presente y para el futuro.*

AGRADECIMIENTOS

A mi hermanos, Carmen, Jorge, Lucho, Carlos y Doris, quienes con su ayuda, apoyo y comprensión me alentaron a concluir con este proyecto. A mi sobrino Luis, por hacerme reír con sus ocurrencias. A mis tíos Julian y Elena, por el apoyo brindado en los momentos buenos y malos de mi vida. A mi familia política, Don Paulo, Doña Carmen, por la ayuda incondicional, por siempre estar dispuestos a colaborar conmigo, pero por sobre todo, por haberme ayudado con mis pequeños.

Al Centro Internacional de la Papa (CIP), por brindarme todas las facilidades en sus instalaciones para realizar el presente trabajo.

A la Dra Sylvie Priou y al Ingeniero Alberto Salas, por darme esta gran oportunidad profesional y por la confianza que depositaron en mí; por su excelente supervisión, apoyo y sugerencias oportunas que me permitieron iniciarme como investigadora, a ustedes el más profundo de mis agradecimientos.

Al Ing. Liliam Gutarra por la paciencia y orientación que me brindo para terminar satisfactoriamente este proyecto de tesis y por las correcciones hechas a este trabajo.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Semillas, Wilder Rodríguez y Carlos García, por su orientación, colaboración y por compartir sus experiencias conmigo. Del mismo modo, quiero agradecer a los técnicos del Laboratorio de Bacteriología Alex Sierralta, Eva Huamán y Fernando de la Calle, por los consejos, materiales y ayuda brindada durante el trabajo práctico de la tesis, gracias por su amistad y por los momentos compartidos.

A mi profesor Asesor Mg. Jorge León por sus consejos, paciencia, orientación, apoyo y por las correcciones hechas a esta tesis que me permitieron culminarla satisfactoriamente.

A los miembros del jurado Dr. Pablo Ramírez, Mg. Susana Gutiérrez, y al Blgo. Héctor Sánchez, por las sugerencias y correcciones hechas a este trabajo.

A las secretarias de la División de Manejo Integrado de cultivos y la División de Conservación y Caracterización de Recursos Genéticos del CIP, Julita Zamudio y Mariana Martín, por la ayuda eficiente, oportuna y con la siempre amigable sonrisa.

A los mis amigos Biólogos, Carmen Maza, María Rivera, Percy Rojas y Benny Ordoñez, por su invalorable ayuda y apoyo.

Finalmente, de manera muy especial , a la Ing. Fanny Vargas, mi gran amiga, gracias por tu afecto sincero, por esas muestras de cariño e invalorable apoyo, y por estar conmigo en las buenas y en las malas.

A todos MUCHAS GRACIAS

INDICE

	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT	III
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEORICO	4
2.1. La papa	4
2.2. Especies silvestres de la papa	4
2.2.1. Importancia de las especies silvestres de la papa	5
2.3. Marchitez bacteriana de la papa	7
2.3.1. Aspectos Generales	7
2.3.2. Agente causal (<i>Ralstonia solanacearum</i>)	8
2.3.3. Sintomatología	15
2.3.4. Diagnóstico	18
2.3.5. Ciclo de la enfermedad	20
2.3.6. Distribución geográfica	22
2.3.7. Importancia económica	24
2.3.8. Control	25
2.4. Estudios genéticos de la resistencia a <i>Ralstonia solanacearum</i>	26
2.4.1. Fuentes de resistencia	28
2.4.2. Mejoramiento genético	35
2.4.3. Selección masal para resistencia a <i>R. solanacearum</i>	38
III. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS	42
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	43
4.1. Lugar de ejecución	43
4.2. Material vegetal	43
4.2.1 Selección de las accesiones y codificación de los genotipos	56

4.2.2. Siembra y transplante de los genotipos	56
4.3. Primer tamizado	57
4.3.1. Prueba de patogenicidad	58
4.3.2. Estandarización del inóculo	58
4.3.3. Infestación del suelo	59
4.3.4. Evaluación de los síntomas de la marchitez bacteriana	59
4.3.5. Confirmación de los síntomas	59
4.3.6..Análisis de infección latente en tallos mediante ELISA-DAS	60
4.4. Segundo tamizado	63
4.5. Tercer tamizado	64
4.5.1. Análisis de la infección latente en tubérculos mediante ELISA- NCM	65
4.6. Análisis de datos	69
V. RESULTADOS	70
5.1. Primer tamizado	70
5.2. Segundo tamizado	77
5.3. Tercer tamizado	90
VI. DISCUSION	96
6.1. Primer tamizado	96
6.2. Segundo tamizado	97
6.3. Tercer tamizado	99
VII. CONCLUSIONES	102
VIII. RECOMENDACIONES	103
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	105
X. ANEXOS	121

LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
Tabla 1.	Clasificación de <i>Ralstonia solanacearum</i> en Biovares de acuerdo a la utilización de disacáridos y a la oxidación de alcohol-hexosas según Hayward (1964) y He <i>et al.</i> (1983).	12
Tabla 2.	Equivalencias entre los Sistemas de Razas y Biovares en la clasificación tradicional de <i>Ralstonia solanacearum</i> según Hayward (1991) y He <i>et al.</i> (1983).	12
Tabla 3.	Equivalencias entre los sistemas de Razas, Biovares y Filotipos en el Complejo de Especies de <i>Ralstonia solanacearum</i> según Prior & Fegan (2005).	15
Tabla 4.	Lista de Entradas evaluadas para su resistencia a la Marchitez Bacteriana de la Papa bajo condiciones de invernadero (28–32°C).	44
Tabla 5.	Lista de Entradas con resistencia al “Tizon Tardío” evaluadas para su resistencia a la Marchitez Bacteriana de la Papa bajo condiciones de invernadero (28–32°C).	55
Tabla 6.	Cepas de <i>R. solanacearum</i> utilizadas en el Segundo Tamizado.	64
Tabla 7.	Lista de entradas evaluadas que presentaron al menos un genotipo resistente a la cepa CIP204 (Biovar 2A). El suelo fue inoculado con <i>R. solanacearum</i> a 108 ufc/g suelo y el experimento fue mantenido bajo condiciones de invernadero a temperatura controlada (28-30°C).	71
Tabla 8.	Lista general del material resistente al “tizón tardío” analizado para su resistencia a la Marchitez Bacteriana usando la cepa CIP204-Bv 2A de <i>Ralstonia solanacearum</i> a	74

1 x 10⁸ ufc/g de suelo bajo condiciones de invernadero (20-32°C).

Tabla 9.	Resumen de especies resistentes al “tizón tardío” analizadas para su resistencia a la Marchitez Bacteriana usando la cepa CIP204-Bv 2A de <i>Ralstonia solanacearum</i> a 1 x 10 ⁸ ufc/g de suelo bajo condiciones de invernadero (20-32°C).	76
Tabla 10.	Lista de genotipos analizados con 7 cepas procedentes de diferentes países de América Latina (Biovar 2A/Filotipo II) a dos concentraciones: 1 x 10 ⁸ y 5 x 10 ⁷ ufc/g de suelo. Las inoculaciones fueron realizadas en invernadero bajo condiciones controladas (28-30°): Segundo Tamizado I.	79
Tabla 11.	Lista de genotipos analizados dos veces con 7 cepas procedentes de diferentes países de América Latina (Biovar 2A/Filotipo II) a dos concentraciones: 1 x 10 ⁸ y 5 x 10 ⁷ ufc/g de suelo. Las inoculaciones fueron realizadas en invernadero bajo condiciones controladas (28-30°C): Segundo Tamizado II.	86
Tabla 12.	Lista de genotipos por especie seleccionadas por su resistencia a al menos 4 cepas de <i>R. solanacearum</i> en ambas dosis bajo condiciones de invernadero (20-32°C).	88
Tabla 13.	Cuadro resumen de los genotipos analizados con 7 cepas procedentes de diferentes países de América Latina (Biovar 2A/Filotipo II) a dos concentraciones: 1 x 10 ⁸ y 5 x 10 ⁷ ufc/g suelo. Las inoculaciones fueron realizadas en invernadero bajo condiciones controladas (28-30°C).	89
Tabla 14.	Número de entradas por especie seleccionadas por su resistencia a al menos 4 cepas de <i>R. solanacearum</i> en	89

ambas dosis bajo condiciones de invernadero (20-32°C).

Tabla 15. Genotipos de especies silvestres analizados para su resistencia a la infección latente en tubérculos después de la inoculación con la cepa CIP204 de *R. solanacearum* a 5×10^7 ufc/g suelo bajo condiciones ambientales durante los meses de Mayo a Agosto en Lima (14-17°C). 91

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
Figura 1.	Cultivo de <i>R. solanacearum</i> en medio Kelman con TZC (48 horas de incubación a 30°C).	9
Figura 2.	Síntomas aéreos de la “Marchitez Bacteriana” causada por <i>R. solanacearum</i> .	16
Figura 3.	A.- Exudado bacteriano saliendo del haz vascular; B.-Pudrición parda del anillo vascular.	17
Figura 4.	Esquema de la Prueba de Elisa-NCM.	19
Figura 5.	Ciclo de la Marchitez Bacteriana de la Papa.	21
Figura 6.	Distribución de <i>R. solanacearum</i> de papa en el Perú.	23
Figura 7.	Siembra y transplante de genotipos de especies silvestre para evaluar la resistencia a la Marchitez Bacteriana de la Papa bajo condiciones de invernadero (20-30°C).	57
Figura 8.	a) y b) Inoculación de cepas de <i>R. solanacearum</i> bajo condiciones de invernadero; c) y d) Toma de las muestras para la Prueba DAS-ELISA.	63
Figura 9.	a) Genotipo de <i>S. acaule</i> resistente a <i>R. solanacearum</i> y b) Genotipo de <i>S. chacoense</i> resistente a <i>R. solanacearum</i> .	76
Figura 10.	Porcentaje de Genotipos por especie seleccionadas para la Prueba de Infección en Tubérculos.	78
Figura 11.	Porcentaje de Plantas Infectadas en la Prueba de Infección de Tubérculos evaluados después de la inoculación con la cepa CIP204 de <i>R. solanacearum</i> a 5×10^7 ufc/g suelo bajo condiciones ambientales durante los meses de Mayo a Agosto en Lima (14-17°C).	92

Figura 12.	Porcentaje de Tubérculos Infectados en la Prueba de Infección de Tubérculos evaluados después de la inoculación con la cepa CIP204 de <i>R. solanacearum</i> a 5×10^7 ufc/g suelo bajo condiciones ambientales durante los meses de Mayo a Agosto en Lima (14-17°C).	93
Figura 13.	Porcentaje Acumulado de Infección en la Prueba de Infección de Tubérculos evaluados después de la inoculación con la cepa CIP204 de <i>R. solanacearum</i> a 5×10^7 ufc/g suelo bajo condiciones ambientales durante los meses de Mayo a Agosto en Lima (14-17°C).	94
Figura 14.	A) Planta y B) tubérculos del Genotipo BW049007 de <i>S. acaule</i> Resistente a <i>R. solanacearum</i> ; C) Planta y D) tubérculos del Genotipo BW0071193 de <i>S. chacoense</i> resistente a <i>R. solanacearum</i> .	95

RESUMEN

La marchitez bacteriana de la papa (MB) causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) (Yabuuchi *et al.*, 1995), es una de las más devastadoras enfermedades que afectan el cultivo de la papa en los países en desarrollo. En la actualidad, no existe un control químico efectivo. De todas las medidas de control, la utilización de variedades genéticamente resistentes es la mejor estrategia de manejo de la enfermedad y la que ofrece mejores perspectivas. El objetivo principal de este estudio fue identificar genotipos de especies silvestres de papa que presenten altos niveles de resistencia a la MB con énfasis en la resistencia a la infección latente en tubérculos. Para ello, se evaluaron 4461 genotipos diferentes de papa silvestre del Banco de Germoplasma del Centro Internacional de la Papa (CIP). 10 plantas por genotipo fueron inoculadas con una suspensión de la cepa CIP204 de *R. solanacearum* a una concentración de 1×10^8 ufc/g de suelo. Para asegurar la durabilidad de la resistencia, los genotipos resistentes fueron evaluados nuevamente contra 7 cepas de *R. solanacearum* con alta agresividad. Los genotipos resistentes a por lo menos 5 cepas fueron sometidos a una tercera prueba donde se evaluó además la resistencia a la infección en tubérculos en condiciones menos severas. Se encontraron 178 genotipos resistentes a la cepa CIP204 (4% de los tamizados). De 162 genotipos resistentes analizados, la resistencia pudo ser confirmada en sólo 52 genotipos en tamizados consecutivos con varias cepas del patógeno, de los cuales 9 genotipos también son resistentes al tizón tardío de la papa. De 26 genotipos analizados para la infección en tubérculos, 7 genotipos (6 de *Solanum acaule* y 1 de *Solanum chacoense*) fueron resistentes a la marchitez en planta y no mostraron infección latente ni en tallos ni en tubérculos. *S. acaule* y *S. chacoense* son las especies más promisorias para los futuros programas de mejoramiento. Esta es la primera evidencia de que altos niveles de resistencia a la marchitez bacteriana existe en la naturaleza.

Palabras clave: MB, papa, resistencia, silvestres, infección latente.

ABSTRACT

The Bacterial Wilt of the Potato (BW) caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) (Yabuuchi *et al.*, 1995), is one of the most devastating illnesses that affect the potato's cultivation in the developing countries. At the present time an effective chemical control does not exist. Of all the control measures of BW, the use of genetically resistant varieties is the best handling strategy of the illness and the one that offer better perspectives. The main objective of this study was to identify genotypes of wild potato species that show high levels of resistance to bacterial wilt with emphasis in the resistance to the latent infection in tubers. For that reason, 4461 different genotypes from the Germoplasm Bank at the International Potato Center (CIP) Lima-Perú, were evaluated. Ten plants per genotype were inoculated with a suspension of the strain CIP204 of *R. solanacearum* to a concentration of 10^8 ufc/g soil. To ensure the durability of resistance, resistant genotypes were tested against seven strains of *R. solanacearum* with various levels of aggressiveness. The genotypes resistant to at least 5 strains of *R. solanacearum* were re-exposed to the pathogen in less severe conditions to assess the presence of latent infection in tubers. 178 genotypes (4%) of all screened were found to be resistant to CIP204 strain. From 162 resistant genotypes analyzed, resistance could be confirmed in only 52 in subsequent screenings with several strains of the pathogen. From these, 9 genotypes are also resistant to Late Blight. From 28 genotypes tested for tuber infection, seven (6 of *S. acaule* and 1 of *S. chacoense*) were found resistant to plant wilt and did not harbour any stem or tuber latent infection. *S. acaule* and *S. chacoense* are the most promising species for future breeding programs. This is the first evidence that high resistance levels of resistance to Bacterial Wilt exist in the nature.

Keywords: BW, potato, resistance, wild, latent infection

I. INTRODUCCIÓN

Los recursos fitogenéticos constituyen la base biológica para la agricultura y la alimentación, contribuyendo así a la seguridad alimentaria. Estos recursos son la materia prima para los programas de mejoramiento genético y el aporte más importante para una producción agrícola sostenible y amigable con el ambiente.

La papa (*Solanum tuberosum* L. Hawkes), es un cultivo de mucha importancia en el ámbito mundial como alimento básico, ya que se encuentra como el cuarto cultivo de mayor producción en el mundo, siendo superado solamente por cereales como el trigo, maíz y arroz (Estrada, 1999; Hawkes, 1994). Este tubérculo forma parte de la dieta de más de 500 millones de consumidores en países desarrollados y sobretodo en América Latina (CIP, La papa en cifras, 1995).

El cultivo de la papa es susceptible a más de 300 enfermedades, pudiendo estas diseminarse por medio de semillas infectadas, agua, implementos agrícolas, insectos, vectores, etc. La presencia de estas enfermedades puede disminuir en gran medida la producción, tal es el caso de la enfermedad conocida como la “ranchar” o “tizón tardío” (causada por el oomiceto *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary), que puede llegar a causar pérdidas mayores al 15% de la producción mundial (Smith and Barker, 1999).

La Marchitez Bacteriana de la papa (MB) o Podredumbre Parda causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) (Yabuuchi *et al.*, 1995), es considerada como la segunda enfermedad más importante después del “tizón tardío”, ya que limita la producción de papa en la mayoría de las regiones tropicales y subtropicales del mundo (French, 1993a; French, 1993b).

Esta enfermedad es severa en condiciones de alta temperatura y humedad siendo favorecida por otros patógenos del suelo (hongos y *nemátodos* principalmente) e insectos que afectan los órganos subterráneos de la papa. Dependiendo del grado de infestación y distribución de la bacteria en el suelo, la “marchitez bacteriana” puede ocasionar la pérdida total del cultivo o un bajo rendimiento del tubérculo (Anguiz, 1993). La diseminación de la enfermedad es variada; sin embargo, la habilidad de *R. solanacearum* de infectar y colonizar tejidos vasculares de la papa (como de otros cultivos y malezas) sin causar síntomas de la enfermedad es la principal forma de diseminación, introducción y establecimiento en muchas eco regiones del mundo (Hayward, 1991; French, 1994: French *et al.*, 1996b).

La MB de la papa es causada en más del 90% de los casos por una variante de la bacteria *R. solanacearum* (raza 3/Biovar 2A/Filotipo II) adaptado al clima frío gracias a una larga asociación con las variedades de papa que crecen en este tipo de climas, aunque sigue siendo una bacteria de alta temperatura óptima (27-28°C), crece en climas fríos y convive con los cultivos de papa en forma de infección latente (French, 1993a; French 1993b; French *et al.*, 1996b). Este patógeno infecta a más de 200 especies de plantas representadas dentro de 40 familias (Seal, 1995), siendo los cultivos mas susceptibles la papa, el plátano, así como el tomate, la berenjena, el ají, el pimiento, el tabaco y el maní (Martín y French, 1985).

Dentro de este contexto se hace difícil el control de la MB debido a la alta variabilidad del patógeno, la amplia gama de hospedantes, su supervivencia en el suelo, su diseminación vía tubérculos semilla con infección latente y por no existir un método de control químico efectivo ni niveles altos de resistencia en ninguno de sus hospedantes.

Una combinación integrada de las medidas de control es lo más apropiado para reducir la incidencia de MB o incluso erradicarla; esto incluye principalmente la utilización de variedades tolerantes y tubérculos semilla libres de la enfermedad, rotación de cultivos con plantas no hospedantes, practicas de saneamiento, adecuado manejo agronómico durante la labranza para evitar lesiones en raíces y estolones, control de nemátodos para evitar la interacción de los mismos con la enfermedad entre otros (Priou *et al.*, 1999a).

De todas las medidas de control de la MB a integrar para contrarrestar la acción patógena de *R. solanacearum*, la utilización de variedades genéticamente resistentes es la mejor estrategia de manejo de la enfermedad y la que ofrece mejores perspectivas (Torres, 1984). Sin embargo hasta la fecha no se cuenta con material con resistencia estable, y las variedades mejoradas por la resistencia a la MB, si bien muestran niveles de resistencia a la marchitez de la planta, transmiten la infección a sus tubérculos. No se ha logrado obtener material con resistencia estable a la enfermedad debido a: 1) la enorme variabilidad fenotípica y genética del patógeno y 2) la reacción de la planta altamente dependiente de los factores ambientales (sobre todo la temperatura) (Anguiz, 1993).

De esta manera se planteó realizar estudios orientados a seleccionar genotipos altamente resistentes a la “marchitez bacteriana”, enfocándonos en la resistencia a la infección en tubérculos causada por *R. solanacearum*.

II. MARCO TEORICO

2.1. LA PAPA

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es el cuarto cultivo más importante en el ámbito mundial, con una producción anual que se encuentra en los 328, 865,936 TM (<http://faostat.fao.org/>). Originaria de los andes centrales de Perú y Bolivia posee dos centros de diversificación: el primero en México Central y el segundo abarca desde los andes de Perú y Bolivia hasta el Nor-oeste de Argentina (Ochoa, 1980; Horton, 1992).

Uno de los más importantes métodos para incrementar la producción de papa es el uso de las variedades mejoradas y las especies silvestres que son una fuente incalculable de genes para obtener resistencia (Tarr, 1972; Khurana *et al.*, 2003; Spooner *et al.*, 2004).

2.2. ESPECIES SILVESTRES DE PAPA

La papa es la planta que posee la mayor cantidad de parientes no solo cultivadas sino también silvestres. Las especies silvestres de la papa agrupan al género *Solanum* L. (Linneo, 1753), el cual es altamente polimorfo y se considera el más importante de la familia *Solanaceae*. Las papas tuberíferas *Solanum* Sección *Petota* contienen cerca de 196 especies, incluyendo la papa cultivada (Salas, comunicación personal).

Actualmente se considera la existencia de alrededor de 187 especies silvestres, de todas estas es posible encontrar por lo menos 92 en el Perú (A. Salas, comunicación personal).

2.2.1. Importancia de las especies silvestres

Los ancestros de la papa cultivada actual se encuentran en las especies silvestres que tienen un valor singular por tres razones principales:

- El número de especies silvestres y cultivadas es de aproximadamente 200; y si se cuentan las diversas variedades de cada una, pasan de 2500 con características variables. Lo cual aumenta la probabilidad de encontrar características deseables en este cultivo (Estrada, 1999).
- La mayoría de las especies silvestres se pueden cruzar con las especies cultivadas debido a que no tienen diferencias básicas estructurales en sus cromosomas. No es difícil lograr el apareamiento cromosómico entre diferentes especies. Esta característica es definitiva para obtener fertilidad y facilitar la transferencia de genes de los híbridos a las generaciones siguientes (Estrada, 1999).
- Las especies silvestres, durante miles de años, se han encontrado sometidas constantemente a selección natural en un gran rango de hábitats que llegaban a ser muy desfavorables. Debido a esto muchas especies silvestres han desarrollado características hereditarias valiosas para su supervivencia, volviéndose tolerantes a diferentes presiones ambientales, así como desarrollando fuerte resistencia a un gran rango de plagas y enfermedades (Hawkes, 1994). Entre las propiedades hereditarias de las especies silvestres también se encuentran atributos provechosos para su calidad culinaria o

industrial, como un alto contenido de materia seca, proteínas y vitaminas. Por esta razón constituyen un reservorio de genes de valor incalculable para características de resistencia, así como adaptación a factores físicos y climáticos como heladas, sequía, granizo, suelos salinos, suelos ácidos, etc (Estrada, 1999).

***Solanum acaule*.**- Es la especie más resistente al frío que se conoce y ha sido utilizada en el pasado para transferir estas características a las papas cultivadas (Hawkes & Hjerting, 1989). Además ha sido reportada como resistente a *Globodera rostochiensis*, *G. pallida* (Potato Cyst Nematode); Potato Virus Y (PVY), Potato Virus X (PVX); Potato Leaf Roll Virus (PLRV); Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd) y al hongo *Synchytrium endobioticum* (Wart), y otros patógenos como *Phytophthora infestans*, *Synchytrium endobioticum*, *Spongospora subterranea*, *Alternaria solani*, *Verticillium albo-atrum*, *Ralstonia solanacearum*, *Corynebacterium sepedonicum*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Epitrix cucumeris*, *Premnotrypes suturicallus*, *Meloidogyne incognita*, *Ditylenchus* sp. Es resistente al calor, salinidad, y posee un contenido de materia seca bastante alto (Correl, 1962; Hawkes & Hjerting, 1989; Hawkes, 1990; Bamberg *et al.*, 1994; Estrada, 1999).

***Solanum chacoense*.**- El valor de esta especie para mejoramiento es grande, ya que ha sido reportada con ciertos niveles de resistencia a *Phytophthora infestans*, Potato Virus X (PVX), Potato Virus Y (PVY), Potato Leaf Roll Virus (PLRV), *Synchytrium endobioticum*, *Spongospora subterranea*, *Alternaria solani*, *Verticillium albo-atrum*, *V. Dahliae*, *Fusarium* spp. *Macrophomina pustulans*, *Oospora pustulans*, *Rhizoctonia solana*, *Corynebacterium sepedonicum*, *Myzus persicae*, *Empoasca fabae*, *Epitrix cucumeris*, *Phthorimaea operculella*, *Ditylenchus destructor* y *D. Dipsaci*. *Globodera rostochiensis* y *G. pallida* (Potato Cyst Nematode); *Streptomyces scabies* (common scab); *Ralstonia solanacearum* (Bacterial Wilt); *Erwinia carotovora* (soft rot/blackleg);

Meloidogyne incognita (root-knot nematode) y *Leptinotarsa decemlineata* (Colorado beetle), resistente a heladas, calor, salinidad, sequías y posee un alto contenido de almidón (materia seca y proteínas) (Thung, 1947; Correl, 1962; Hawkes & Hjerting, 1969; Hawkes, 1990; Bamberg *et al.*, 1994; Estrada, 1999).

2.3. LA MARCHITEZ BACTERIANA DE LA PAPA

2.3.1. Aspectos Generales

La marchitez bacteriana de la papa (MB) es considerada como una de las enfermedades más importantes de origen bacteriano que afecta el cultivo de papa. El agente causal es la bacteria *R. solanacearum*, y se encuentra distribuida en las regiones de climas tropicales, subtropicales y templados del mundo (Martin & French, 1996). La enfermedad ha sido reportada en todos los países productores de papa de latinoamérica, se encuentra presente en Estados Unidos y Australia. En África, es un problema muy serio para países como Uganda, Etiopía, Kenia, Madagascar, Ruanda, Burundi, Nigeria y Camerún. En el sur de Asia se presenta en India, Pakistán, Nepal y Bután. En el este y sudeste de Asia, la MB constituye una enfermedad muy severa en Indonesia, Filipinas, sur de Vietnam, Laos, Japón y sur de China. A comienzo de los noventa, la MB se convirtió en una seria amenaza para países europeos productores de papa tales como Bélgica, Inglaterra, Francia, Holanda, España, Italia y Portugal. La enfermedad se ha reportado en Rusia y Suecia, logrando erradicarla en este último país (Priou *et al.*, 1999a).

Esta enfermedad afecta alrededor de 5 millones de familias de agricultores (2,0 millones de hectáreas infestadas que representan un 2% de las áreas cultivadas con

papa). En el mundo, aproximadamente 45 países del hemisferio sur están afectados y las pérdidas totales están en 950 millones de dólares por año (Priou *et al.*, 1999a).

En el Perú, el cultivo de papa es el más importante en la zona andina. La superficie cultivada en el país es de 249,000 ha, la mayoría de los productores son de escasos recursos y cultivan en promedio, media hectárea de papa. A pesar de que existe un sistema formal de producción de semilla de papa, el informal predomina, la mayoría de esta semilla es de baja calidad, siendo éste uno de los factores que contribuye a mantener los rendimientos a un nivel muy bajo (9,6 t/ha), (Priou *et al.*, 2001a).

La mayoría de géneros pertenecientes a la familia Solanaceae pueden ser infectados y también más de 200 especies de otras familias de plantas superiores (Kelman *et al.*, 1994). La MB es una enfermedad cuarentenaria de origen de suelo causada en más del 90 % de los casos, por una variante de la bacteria *Ralstonia solanacearum* raza 3/Biovar 2A adaptada al clima frío (French, 1993a; French 1993b).

En el Perú, la enfermedad es conocida con los nombre de “bacteriosis”, “podredumbre parda”, “seca seca”, “borrachera”, “mata todo” y “pisca”; en otros países se le conoce como “brown rot” (en idioma ingles), “bacteriose vasculaire” (en idioma francés), “murcha bacteriana” (en idioma portugués) y q’awi” (en quechua boliviano).

2.3.2. Agente causal (*Ralstonia solanacearum*)

El patógeno causante de la marchitez bacteriana es la bacteria *R. solanacearum* (Smith, 1896) (Yabuuchi *et al.*, 1995). Anteriormente fue llamado con sinónimos tales como: *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas solanacearum*,

Xanthomonas solanacearum, *Phytoplasma solanacearum*, *Bacterium solanacearum* y *Bacillus solanacearum* (Kucharek, 1998)

Según el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática (Krieg & Hold, 1984), *R. solanacearum* es una bacteria ubicada en la sección “bastones y cocos aeróbicos Gram negativos”. Las células bacterianas tienen forma de bastón, con un diámetro de 0,5-0,7 μm y una longitud de 1,5-2,5 μm , con 2 a 3 flagelos polares que le dan movilidad dentro del agua (Martin & French, 1996). *R. solanacearum* es una bacteria aerobia que no forma espora ni cápsula, reduce nitratos y forma amoníaco (Hooker, 1980).

Debido a la variación entre sus numerosas cepas, la temperatura óptima de crecimiento varía entre 27-37°C. La máxima temperatura de crecimiento varía entre 35-41°C y la mínima entre 8-18°C. Su aislamiento en medio TZC (cloruro trifenil tetrazolio) de Kelman, permite diferenciar sus colonias por la apariencia típicamente cremosa, lisa y de coloración blanca con ligero espiralado interno (Kelman, 1953) (Figura 1).

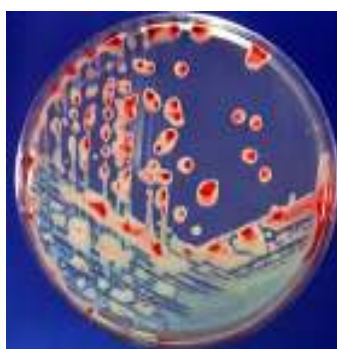


Figura 1. Cultivo de *R. solanacearum* en medio Kelman con TZC (48 horas de incubación a 30°C) (Priou *et al.*, 1999a)

R. solanacearum es capaz de producir enzimas: pectinmetilesterasa, poligalacturonasa y altos niveles de celulasa; los cuales, si bien no son los determinantes primarios de la patogenicidad, son responsables de la destrucción de los tejidos parenquimáticos y del floema. La celulasa está relacionada estrechamente con la patogénesis al producir la degradación de la celulosa en la planta enferma (Kelman ,1954).

2.3.2.1. Clasificación taxonómica:

La clasificación taxonómica actual de *Ralstonia solanacearum* es la siguiente:

Reino: Eubacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Betaproteobacteria

Orden: Burkholderiales

Familia: Burkholderiaceae

Género: *Ralstonia*

Especie: *Ralstonia solanacearum*

(Smith 1896) Yabuuchi *et al.* 1995

2.3.2.2. Sistema tradicional de clasificación

R. solanacearum comprende un complejo grupo taxonómico de variantes, por lo que han sido clasificadas de diversas maneras, siendo los sistemas tradicionales más aceptados el de Razas (R) y Biovares (Bv).

2.3.2.2.1. Sistema de Razas

El sistema de razas esta basado en la gama de hospedantes en condiciones de campo, distribución geográfica, patogenicidad, relaciones epidemiológicas y propiedades fisiológicas (Hayward, 1991), existiendo actualmente 5 razas: raza 1, raza 2, raza 3, raza 4 y raza 5.

Las variantes de la raza 1 es común encontrarlas en las regiones bajas, en los trópicos y subtrópicos de climas cálidos, afectando una amplia gama de Solanáceas y otras familias que incluyen la papa y varias malezas. La raza 2 esta limitada a las plantas de la familia *Musaceae* incluyendo el plátano triploide, platanillo y *Heliconia spp.* en los trópicos de las Américas y Asia. La raza 3 afecta principalmente la papa, ocasionalmente a tomate y otros cultivos y malezas solanáceas, es común encontrarlas en altitudes y latitudes mayores (climas fríos). La raza 4 fue propuesta adicionalmente para variantes cuyos hospedantes se limitan a la mora en China (He *et al.*, 1983), y en numerosos hospedantes se presenta una raza desconocida, y la raza 5 también ataca la mora (Hayward, 1991).

2.3.2.2.2. Sistema de Biovares

Hayward (1964), separó las variantes de *R. solanacearum* en cuatro biotipos ahora denominados Biovares (Bv). Este sistema se basa en la capacidad de la bacteria para utilizar tres disacáridos (lactosa, maltosa y celobiosa), y la oxidación de tres alcoholes (manitol, sorbitol y dulcitol). He *et al.* (1983) sugirieron el Biovar 5, el cual oxida lactosa, maltosa celobiosa y manitol (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de *Ralstonia solanacearum* en Biovares de acuerdo a la utilización de disacáridos y a la oxidación de alcohol-hexosas según Hayward (1964) y He *et al.* (1983).

Pruebas Bioquímicas	BIOVARES				
	1	2	3	4	5
<i>Utilización de:</i>					
Lactosa, Maltosa y Celobiosa	-	+	+	-	+
<i>Oxidación del:</i>					
Manitol	-	-	+	+	+
Sorbitol y Dulcitol	-	-	+	+	-

+: Producción de ácido como consecuencia de la utilización de los disacáridos.

Existe una equivalencia entre raza y biovar: la Raza 3 coincide con el biovar 2A (Hayward, 1991). La Raza 1 coincide con todas las variantes del Biovar 4 y algunas variantes de los Biovares 1 y 3; mientras que la Raza 2 incluye las variantes restantes del Biovar 1 y 3. Todas las variantes del Biovar 5 corresponden a la Raza 4. (He *et al.*, 1983). No se ha establecido ninguna raza para el biovar 2T, el cual se encuentra principalmente en las tierras bajas de la cuenca amazónica. Tiene numerosas variantes con una amplia gama de hospedantes al igual que la Raza 1; sin embargo, las variantes del Biovar 2T son menos agresivas (Hayward, 1991) (Tabla 2).

Tabla 2. Equivalencias entre los Sistemas de Razas y Biovares en la clasificación tradicional de *Ralstonia solanacearum* según Hayward (1991) y He *et al.* (1983).

Razas	Biovares	Hospedantes	Distribución geográfica
1	1,3,4	Solanáceas y otros	Zonas bajas de los trópicos
2	1,3	Musáceas = Moko	América y Asia tropical
3	2A	Papa, tomate	Zonas frías
4	5	Mora	China
Desconocida	2T	Numerosos	Zonas bajas de Sudamérica

La MB se encuentra presente en zonas altas y frías tropicales (hasta 3400 m.) (Priou *et al.*, 2001a) donde se desarrolla principalmente la Raza 3 (Biovar 2A), siendo la más común en papa y generalmente asociada con infección latente, con la tendencia a desaparecer en pocos años.

En cambio, la Raza 1, por sus numerosos hospedantes, persiste normalmente durante muchos años y sobrevive mejor en el suelo y malezas, se encuentra con mayor frecuencia en climas cálidos (tropicales y sub- tropicales bajos) (French, 1996a). Se sabe que la Raza 3 de *R. solanacearum* está adaptada a bajas temperaturas, las cuales se presentan principalmente en las altitudes y latitudes extremas en la distribución del patógeno (Robinson- Smith *et al*; 1995).

La distribución de la Raza 3 en áreas templadas frías es debida a su asociación con papa y a su habilidad para sobrevivir bajo temperaturas frías en las áreas más adecuadas para este cultivo. De este modo, *R. solanacearum* Raza 3 puede tener una limitada distribución en regiones tropicales o de temperatura caliente debido a su restringido rango de hospedantes, a su cercana afinidad con papa y la probable rápida declinación del patógeno en condiciones de climas cálidos y suelos húmedos donde los rastros del hospedante son rápidamente degradados. Por consiguiente, la raza 3 se encuentra en regiones tropicales y pudo haber sido introducida con papa antes de ser un habitante natural de ese medio ambiente. En condiciones de clima frío propias de las zonas de producción de semilla, la bacteria se encuentra en bajas poblaciones presentándose como infecciones latentes (Ciampi *et al.*, 1980). Por lo tanto, el conocimiento de la estructura de raza y biovar es fundamental para la implementación de una estrategia de control.

2.3.2.3. Clasificación por filotipos

Recientemente se ha establecido un nuevo sistema de clasificación para el complejo de especies de *Ralstonia solanacearum* (Tabla 3), el cual está basado en el análisis filogenético de los datos de secuencia generados a partir de la región interna del espacio transcrito o región ITS (Internal Transcribed Spacer) del 16S-23S, del gen *hrp*, que codifica la endonucleasa, y del gen *mutS*, los cuales codifican para la proteína reparadora de errores de apareamiento del DNA (Prior y Fegan, 2005). El complejo de especies de *Ralstonia solanacearum* incluye a *R. solanacearum*, *R. syzygii* (el patógeno de la enfermedad del “Clavo de Sumatra”) y la Enfermedad Bacteriana de la Sangre de Banana (BDB), las dos últimas presentes sólo en Asia.

Tabla 3. Equivalencias entre los sistemas de Razas, Biovars y Filotipos en el Complejo de Especies de *Ralstonia solanacearum* según Prior & Fegan (2005).

Filotipo	Biovar	Raza	Hospedantes	Distribución Geográfica
I	3, 4, 5	1, 4, 5	Solanáceas, maní, jengibre, papa (regiones bajas)	Asia
II	1, 2, 2T	1, 2, 3	<p>- Grupo de amplio rango de hospedantes (Solanáceas, Musa)</p> <p>- Grupo de estrecho rango de hospedantes (Papa, Moko)</p> <p>- Grupo de amplio rango de hospedantes (frecuentemente Bv 1) patogénicos en papa (regiones bajas)</p> <p>- Grupo de estrecho rango de hospedantes patogénicos en papa (regiones frías), otras solanáceas, plátano y heliconias.</p>	América
III	1, 2T	1	Papa y otras solanáceas en las regiones bajas y áreas montañosas	África e islas circundantes
IV	1, 2, 2T <i>R. syzygii</i> y BDB	1, 3	Papa (regiones bajas), otras solanáceas, clavo y plátano.	Indonesia

2.3.3. Sintomatología

2.3.3.1. En las zonas aéreas de la planta

En las partes aéreas de la planta, la enfermedad se caracteriza por la marchitez de uno de sus lados, afectando los folíolos de un lado de la hoja, las hojas de un lado del tallo, o sólo algunos tallos de la planta produciendo marchitamiento, epinastía, acaparamiento o enanismo y amarillamiento de follaje (marchitez unilateral)

(French, 1993a, French, 1993b) (Figura 2). Estos síntomas pueden confundirse con los síntomas inducidos por otros agentes patógenos como *Fusarium eumartii*, *Verticillium sp.*, *Erwinia chrysanthemi*, daños mecánicos o por la presencia de insectos en la base del tallo. Posteriormente toda la planta se marchita (debido a la infección temprana y la temperatura relativamente alta) y muere, o el tallo enfermo puede marchitarse completamente y secarse, mientras que el resto de la planta permanece aparentemente sano (French, 1996a).



Figura 2. Síntomas aéreos de la “Marchitez Bacteriana” causada por *R. solanacearum*

Acompañando al avance de la marchitez foliar, el sistema vascular va a adquiriendo un color marrón pardo y en tallos jóvenes se pueden observar estrías necróticas debajo de la epidermis. También el exudado puede ser observado a manera de gotas mucosas en el tejido vascular de los tallos. Si se corta un pedazo de 2-3 cm. de largo desde la base del tallo infectado y colocándolo en un recipiente con agua limpia, en pocos minutos se observarán filamentos finos que salen de uno o ambos extremos del tallo cortado que corresponden al flujo bacteriano, esto refleja la presencia y actividad de *R. solanacearum* en el sistema vascular. Esta prueba de diagnóstico rápido en campo se denomina *Prueba de Flujo Vascular* (Martin & French, 1996).

El incremento en la viscosidad del agua dificulta el paso del líquido por el xilema hacia la parte aérea debido a la formación del mucílago alrededor de las masas

de bacterias en los vasos del xilema del tallo y a una alta afinidad de los exopolisacáridos (EPS) de *R. solanacearum* por el agua, constituyendo el determinante primario de la patogenicidad (Martin & French, 1996). En una sección longitudinal de los tallos afectados es fácil observar rayas estrechas oscuras bajo la epidermis que corresponden a la actividad enzimática de la bacteria en los conductos xilemáticos (Priou *et al.*, 1999c).

2.3.3.2. En Las zonas subterráneas de la planta

Los síntomas en los tubérculos de papa son más notorios debido a que en infecciones severas, después de la cosecha, los ojos del tubérculo o los extremos del estolón exudan gotas de aspecto lechoso que contienen a la bacteria patógena aglutinada, pudiendo llegar a producir la pudrición de los tubérculos (pudrición parda) (Figura 3). Los tubérculos afectados retienen inicialmente su consistencia y adquieren un leve olor característico, luego se van descomponiendo hasta desintegrarse completamente debido a ataques secundarios de saprofitos (Martin & French, 1996).

En los tubérculos afectados, al hacer un corte transversal cerca de la inserción del estolón, se puede observar la coloración parduzca del anillo vascular y ejerciendo una ligera presión externa se aprecia el típico exudado bacteriano (perlas bacterianas), saliendo de los haces vasculares.

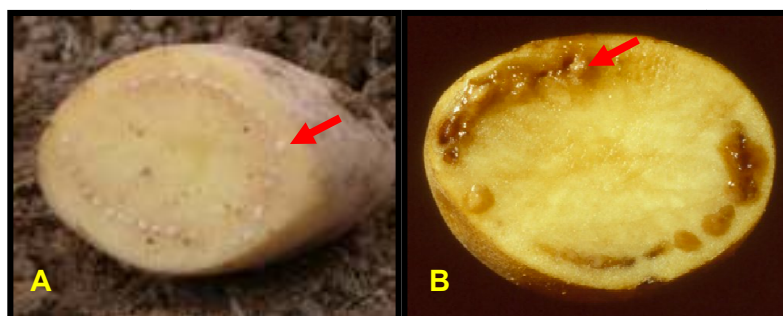


Figura 3. A: Exudado bacteriano saliendo del haz vascular; **B:** Pudrición parda del anillo vascular (Priou *et al.*, 1999a)

2.3.4. Diagnóstico

La pudrición parda puede confundirse con los de la pudrición anular causada por *Clavibacter michiganensis* sp. *sepedonicus* (Gram +). Sin embargo una prueba diferencial y rápida consiste en colocar 2 gotas de hidróxido de potasio (KOH) al 3% directamente sobre el exudado bacteriano del tubérculo (Suslow *et al.*, 1982) y luego mezclar con un mondadientes de madera por 10 segundos, la formación de un hilo lechoso al levantarlo indicará la presencia de *R. solanacearum* (Gram -), mientras que las bacterias Gram + son solubles en esta solución (Prueba de KOH) (Martin & French, 1996).

Puede darse el caso en que no todos los tubérculos infectados muestren síntomas evidentes, siendo este el caso de infección latente. En años anteriores, la infección latente sólo podía ser detectada manteniendo los tubérculos a una temperatura de 30°C, con alta humedad relativa, y al cabo de 2 ó 3 semanas se podía observar la exudación de masas bacterianas a través de los ojos (Martin & French, 1985); sin embargo, en estas condiciones muy a menudo otros patógenos o saprofitos pueden causar pudriciones que impiden diagnosticar a la MB, por lo que en el Centro Internacional de la Papa (CIP) se ha desarrollado una técnica serológica rápida, altamente sensible y específica: Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima) (ELISA-NCM) post-enriquecimiento para la detección de *R. solanacearum* en tubérculos con infección latente (Priou *et al.*, 1999b) (Figura 4).

PRUEBA SEROLÓGICA

ELISA-NCM

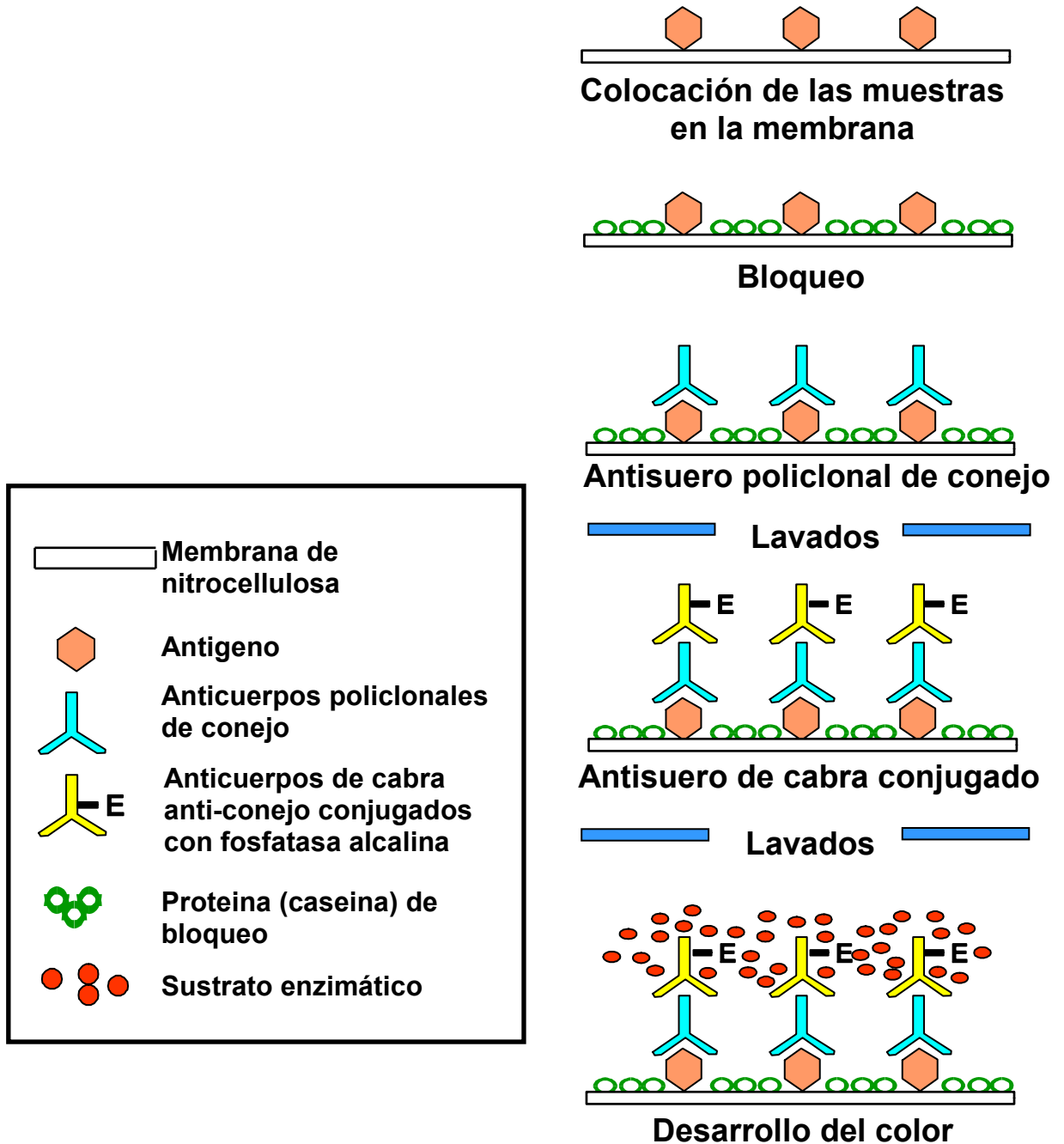


Figura 4. Esquema de la Prueba de Elisa-NCM (Priou *et al.*, 1999b)

2.3.5. Ciclo de la enfermedad

La marchitez bacteriana de la papa presenta las siguientes fases (Figura 5):

2.3.5.1. Fuentes de inóculo

Las principales fuentes de infección de cultivos de papa con *R. solanacearum* son: papas infectadas (tubérculo-semilla infectados con infección latente), restos de cosecha o plantas infectadas con MB y/o suelos infestados (Martin & French, 1985). También se puede diseminar la bacteria a través de la irrigación de campos con agua de riego contaminada y del suelo contaminado que se adhiere a los implementos agrícolas (Martin & French, 1985), generando nuevos focos de infección.

El nivel de infestación de los suelos está en función del carácter supresivo del suelo, de las variantes del patógeno, de la sobrevivencia en los residuos de plantas cosechadas, así como de las raíces de cultivos y malezas asintomáticas, los cuales en muchos casos se comportan como los lugares de refugio del patógeno (Priou *et al.*, 1999c).

2.3.5.2. Supervivencia

Esta bacteria puede sobrevivir en el suelo debido a siembras sucesivas de un cultivo susceptible, en rastrojos o en tubérculos de papa con infección latente, en el sistema radicular y en la rizósfera de muchos hospedantes (malezas hospedadoras o cultivos hospedantes, papas voluntarias, etc) (Granada y Sequeira, 1983).

Del mismo modo se sabe que la supervivencia de la bacteria está sujeta a factores ambientales tales como la temperatura, humedad y otros factores fisicoquímicos del suelo, por lo que esta bacteria puede sobrevivir durante muchos

años en ciertos suelos o desaparecer de una temporada de cultivo a otra (Martin y French, 1996).

2.3.5.3. Diseminación

R. solanacearum se disemina principalmente a través de tubérculo-semilla latentemente infectado (Cook y Sequeira, 1994) producidos en climas fríos (sobre los 2500 de altitud) que no presentan síntomas visibles de la enfermedad, pero que al sembrarse en lugares cálidos, desarrollan síntomas severos de MB. Esta bacteria también puede diseminarse a través de suelo infestado adherido a los zapatos, herramientas de agricultores, cascos y patas de animales y agua de riego contaminada (Priou *et al.*, 1999a).

R. solanacearum puede penetrar por raíces sanas (Kelman & Sequeira, 1965), raíces que han sufrido daño mecánico durante la siembra y cosecha o daños ocasionados por nematodos (Napiere & Quimi, 1980), así como por las heridas causadas por hongos e insectos después de la emergencia de la planta (Priou *et al.*, 1999a).



Figura 5. Ciclo de la Marchitez Bacteriana de la Papa (Priou *et al.*, 1999a)

2.3.6. Distribución geográfica

Esta enfermedad está ampliamente distribuida (en más de 65 países sólo en el hemisferio sur) y es común en las regiones de climas tropicales, subtropicales y templados del mundo, limitando la producción de papa en Asia, África, América Central y del Sur. También puede ocurrir en climas más fríos como en altitudes relativamente grandes (www.senasa.gob.pe).

La MB es una enfermedad que está ocasionando grandes pérdidas a nivel mundial. En Latinoamérica, la enfermedad ha sido reportada en todos los países productores de papa excepto Ecuador. En Norte América la raza 1 se encuentra presente en Estados Unidos y se presenta sólo en plantas de geranio. En Australia es una enfermedad de gran importancia y en África es un serio problema para países como Uganda, Etiopía, Kenia, Rwanda, Burundi, Nigeria y Camerún. En algunos países asiáticos ha llegado incluso a causar hasta el 75% de pérdidas de la cosecha del cultivo de papa (Cook & Sequeira, 1994). A comienzos de los noventa se convirtió en una grave amenaza para los países europeos productores de papa incluyendo Bélgica, Inglaterra, Países Bajos, España, Italia y Portugal.

Desde 1965 en que fue reportada por primera vez en el Perú, ésta se encuentra atacando cultivos de papa en los departamentos de Amazonas, Ancash, Cajamarca, Huánuco, La Libertad y Piura (Priou *et al.*, 2001a.) (Figura 6).

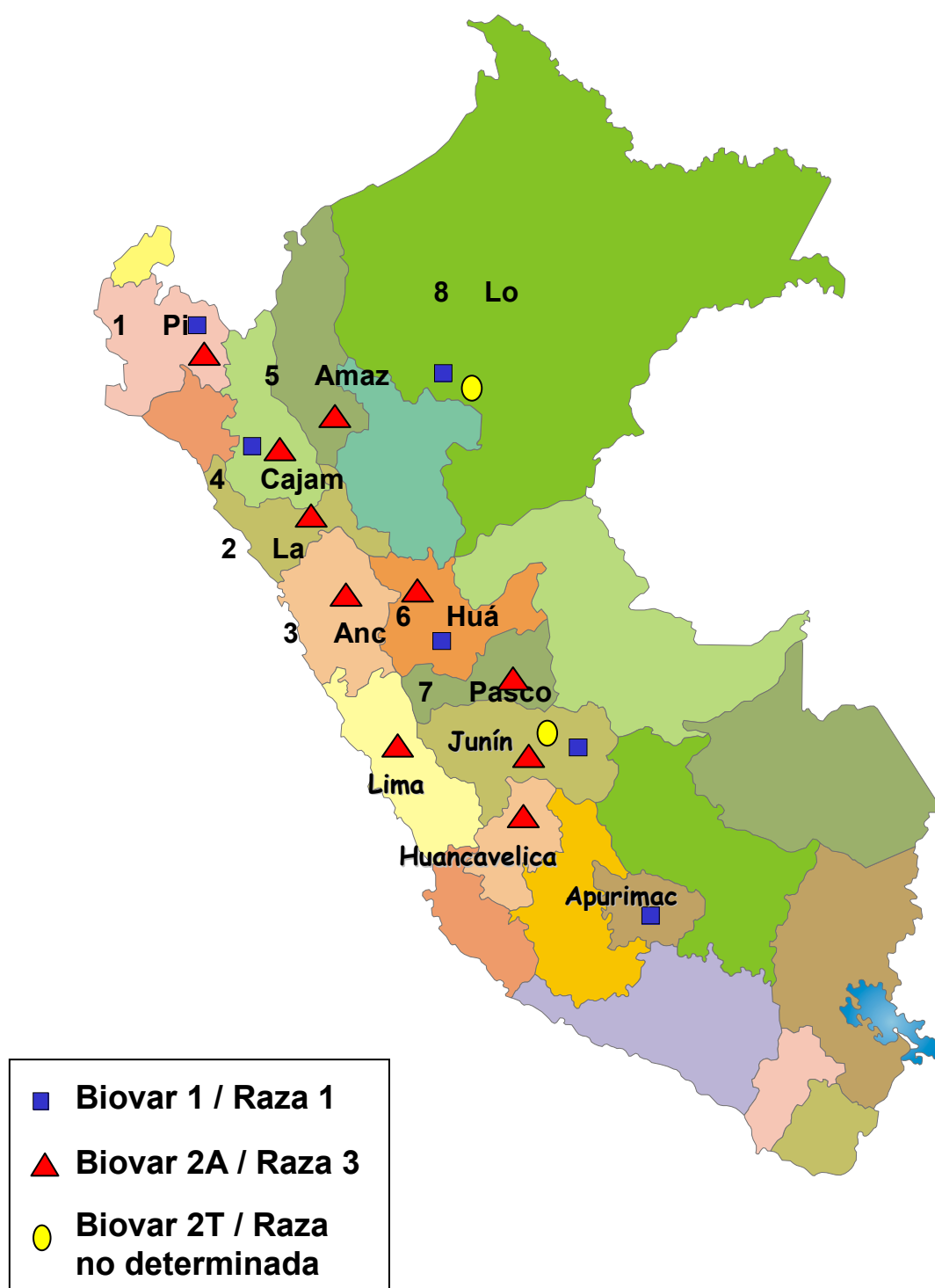


Figura 6. Distribución de *R. solanacearum* de papa en el Perú (Priou *et al.*, 1999a)

2.3.7. Importancia económica

El cultivo de la papa, hasta el año 1987 ocupaba el cuarto lugar entre los principales cultivos alimenticios del mundo (CIP, La papa en cifras, 1995). Actualmente el Perú ocupa el segundo lugar en superficie de siembra respecto a los cultivos anuales de mayor importancia. Se cultiva a lo largo de toda la sierra del Perú y se le encuentra desde la sierra de Piura, Cajamarca y Amazonas en el Norte hasta el Altiplano de Puno y la sierra de Tarma por el Centro (French, 1994).

La “Marchitez Bacteriana” de la papa causada por *Ralstonia solanacearum*, es actualmente una de las enfermedades de mayor importancia en el mundo, el gran número de trabajos publicados sirven como evidencia de su gran significado en la economía de la agricultura de muchas regiones (Kelman, 1953).

En el Perú, el cultivo de la papa, es el más importante de la zona andina. La superficie cultivada en el país es de 249 000 ha, la mayoría de los productores son de escasos recursos y cultivan, en promedio, media hectárea de papa. A pesar de que existe un sistema formal de producción de semilla de papa, el informal predomina, la mayoría de esta semilla es de baja calidad, siendo uno de los factores que contribuye a mantener los rendimientos a un nivel muy bajo (9,6 t/Ha) (Priou *et al.*, 2001).

Estudios realizados en 1998 y 1999 por SENASA en Cajamarca y Huánuco, indican que aproximadamente de 8 000 a 10 000 Ha de un total de 57 200 ha de papa, están infestadas con MB (SENASA, 1999). Así mismo, se ha observado que durante la cosecha, la MB produjo del 30 al 90% de reducción en el rendimiento, llegando hasta el 98% de pérdidas en almacenamiento (www.senasa.gob.pe).

2.3.8. Control

El control de la MB se hace difícil debido a la alta variabilidad del patógeno, a la amplia gama de hospedantes, su supervivencia en el suelo, su diseminación vía tubérculo- semilla con infección latente y por no existir un método de control químico efectivo ni niveles altos de resistencia en ninguno de sus hospedantes.

Una combinación integrada de medidas de control es lo más apropiado para reducir la incidencia de MB o incluso erradicarla, esto incluye principalmente (French, 1996a; Priou *et al.*, 1999a):

- La siembra de tubérculo-semilla libre de la enfermedad
- La utilización de variedades tolerantes que debe asociarse al uso de semilla sana y a otras formas de control ya que no existen hasta el momento altos niveles de resistencia o inmunidad. No obstante nuevos clones de papa están mostrando niveles de resistencia a la MB, pero no han desarrollado resistencia a la infección (latente y visible) en tubérculos (Priou *et al.*, 1999a).
- Rotación de cultivos con plantas no hospedantes por lo menos dos años, duración que depende de la incidencia inicial y de las condiciones agro-ecológicas, pudiendo realizarse una rotación con cereales, liliáceas, brasicáceas, leguminosas y cucurbitáceas para así disminuir el potencial de inóculo en el suelo.
- Prácticas de saneamiento tales como la eliminación de rastrojos de papa, remoción de tubérculos infestados y/o podridos, eliminación de malezas, plantas voluntarias de papa, plantas marchitas, desinfección de herramientas de trabajo y maquinaria, zanjas de desviación de agua de riego o de escorrentía.
- Adecuado manejo agronómico durante la labranza, siembra y aporque para evitar lesiones en raíces, tallos y estolones (Martin & French, 1985)

- Control de nemátodos e insectos para evitar la interacción de los mismos con la enfermedad (Priou *et al.*, 1999a).
- Medidas cuarentenarias, las cuales deben ser tomadas cuando se haya detectado la enfermedad en un área para evitar que la MB se disemine hacia zonas libres de la bacteria. Si bien dichas medidas merman la economía de una determinada región, su menosprecio favorece la diseminación de la enfermedad (Martin & French, 1985).

2.4. Estudios Genéticos de resistencia a *Ralstonia solanacearum*

Existe poca información sobre el número y la acción de los genes que controlan la resistencia a la MB en papa. Los reportes disponibles se refieren básicamente a los estudios realizados con clones de *Solanum phureja* y la Raza 3 de *R. solanacearum* (Anguiz, 1993).

Investigaciones sobre la resistencia en *S. phureja* indicaron que los clones difieren en su reacción a las diferentes cepas de la bacteria (Sequeira & Rowe, 1969). Se encontraron clones con resistencia a 10 aislamientos, pero muchos de ellos fueron susceptibles a uno o más de los aislamientos siendo evidente la necesidad de muchos genes para conferir un amplio espectro de resistencia. El análisis de segregación en progenies de intercruzas de clones de *S. phureja*, determinó que la resistencia a dos aislamientos (K-60 y S-123) sea controlada cada uno por tres genes dominantes e independientes, pero solamente un gen parecía ser común (Rowe y Sequeira, 1970; Rowe et al., 1972). En un estudio similar con el aislamiento S-206 de la raza 3, se confirmó la hipótesis de que la resistencia a la marchitez bacteriana es controlada por cuatro genes mayores (Zalewsky & Sequeira, 1975).

Se han realizado numerosos intentos para determinar si estos tres sistemas de genes están interrelacionados. Se realizaron 4 experimentos en los cuales se estudiaron más de 100 clones de familias híbridas 1386.12 x 13339.28 (R X S). Se inoculó una planta por cada clon con S-206, K-60 o S-123. Se encontraron clones resistentes o susceptibles a uno dos o tres de las cepas. Asimismo se obtuvieron ocho patrones posibles de segregación. Se analizó el buen ajuste de estos resultados a los valores esperados de las combinaciones de genes. Este análisis no diferenció claramente un sistema en el que solamente un gen es común con un sistema en el que todos los genes son independientes. Desafortunadamente sin la explicación clara, ninguno de los cuatro experimentos separados coincidieron en resultados. Debido al alto costo y laboriosidad de estos experimentos, los trabajos genéticos de resistencia fueron descontinuados (Sequeira, 1979).

La resistencia a *R. solanacearum* disponible en la actualidad, principalmente fue originado a partir de *S. phureja* y es controlado por pocos genes. A menudo se expresa como inmunidad ya que es superada cuando se incrementa el nivel de los factores favorables para esta enfermedad: temperatura, composición del suelo, daños en las raíces, etc. De esta manera, resistencia puede significar que pocas plantas sean infectadas. La resistencia no es general, sino específica de la cepa y del medioambiente, un paso esencial en el desarrollo de variedades resistentes es el tamizado local (Martin & French, 1996)

Un nivel aceptable de resistencia depende del uso de las papas producidas. Cuando se usa para consumo, un cierto porcentaje de infección puede ser tolerado. En producción de semilla, es preferible no tolerar nada de infección, debido a que pocas semillas infectadas pueden diseminar la enfermedad a grandes áreas (Martin & French, 1996)

Diferentes tipos de germoplasma han sido producidos por el CIP (Martin & French, 1996):

Familias de tubérculos: Aunque una familia de tubérculos se origina del mismo cruce, cada tubérculo resultante es un clon genéticamente diferente. Los clones individuales pueden primero ser multiplicados y luego evaluados en el campo mediante siembra combinada con un cultivo susceptible en un campo infestado.

Clones Selecto: Los clones selectos se originan de familias de tubérculos que ya han sido sometidos a una prueba de resistencia. Pueden estar disponibles en sets de 5 tubérculos por clon. Estos pueden ser luego evaluados en un diseño experimental al azar o de un solo punto.

Clones avanzados: Los clones avanzados han sido producidos mediante varios ciclos de inoculación y sus características agronómicas han sido evaluadas. Estos pueden ser evaluados en un diseño de bloques al azar.

2.4.1. Fuentes de Resistencia

Thung en 1947, fue uno de los primeros investigadores que buscó posibles fuentes de resistencia a la MB. Él estudió la resistencia de *Solanum andigenum*, *S. caldasii*, *S. antipoviezii*, *S. chacoense* y *S. demissum*, y de híbridos derivados de los cruces con *S. tuberosum*.

Nielsen y Haynes desde 1947 a 1959, evaluaron cerca de 9000 genotipos, la mayoría de *S. tuberosum*, con procedimientos de laboratorio y campo. Encontraron que todas las papas estudiadas eran susceptibles a la MB. Sin embargo, en algunos

clones los síntomas aparecieron tarde, y la progresión de la enfermedad fue más lenta que en la de los controles susceptibles. El desarrollo lento de la enfermedad fue interpretado como resistencia, aunque la proporción de plantas marchitas fue similar al de los controles. Usando esta presunción, seleccionaron tres clones resistentes a la raza 1: Prisca, 2983 y 2777. Sin embargo, debido a sus características tardías de maduración, no se usaron mucho en los programas de mejoramiento (Nielsen & Haynes, 1960).

En 1965, el inventario de las especies tuberíferas del banco de germoplasma de Sturgeon Bay, publicado por la Universidad de Wisconsin, reporta como especies silvestres resistentes a la MB a: *S. acaule*, *S. acroscopicum*, *S. berthaultii*, *S. brevidens*, *S. bulbocastanum*, *S. cardiophyllum*, *S. clarum*, *S. curtilobum*, *S. demissum*, *S. hjertingii*, *S. phureja*, *S. pinnatisectum*, *S. stenotomum* y *S. tuberosum* (Agricultural Experiment Station, 1965).

Thurston y Lozano (1968) descubrieron la primera fuente de resistencia más importante y útil. Ellos evaluaron la resistencia a *R. solanacearum* en 1,061 cultivares de Colombia, incluyendo *S. andigena*, *S. phureja* y *S. tuberosum*, encontrando alto grado de resistencia en 6 clones de *S. phureja* nativos de Colombia - con pocas hojas marchitas, en comparación a los cultivares comunes usados como testigos - cuando fueron inoculadas con la raza 3 de *Ralstonia solanacearum*. Posteriores evaluaciones indicaron altos niveles de resistencia cuando fueron evaluados a diferentes temperaturas (20, 25 y 30°C), y contra las razas 1 y 2 bajo condiciones de invernadero (Thurston & Lozano, 1968). Estos clones son los que han servido de base para los cruzamientos con *S. tuberosum* y *S. andigena* (Sequeira & Rowe, 1969).

En ese mismo año en Colombia se evaluaron 1561 clones de papa provenientes de Sturgeon Bay (USA). En 1970 se probaron otros clones provenientes

de Wisconsin. De estos sobrevivieron dos clones denominados 5/5 y 7/10, los cuales aunque fueron susceptibles a *Phytophthora infestans*, mostraron cierto grado de resistencia a *R. solanacearum* y fueron altamente resistentes a los virus Y y X de la papa (Navarra & Zapata, 1984).

Rowe y Sequeira (1970) produjeron a partir de *S. phureja*, clones tetraploides de los cuales seleccionaron los cultivares Caxamarca en 1975, Molinera en 1976, considerado como un clon resistente a la MB y al tizón tardío de la papa (Herrera *et al.*, 1977; French y Herrera, 1971), y Amapola (en el CIP, Lima) y Sirena (en Colombia), habiéndose evaluado 950 clones, bajo condiciones de campo (Franco & Smith, 1985). Cuando estos materiales se probaron bajo condiciones de estrés y altas temperaturas (22-24° C) como las que se presentan en Brasil, Indonesia, Bangladesh, Argentina y Uruguay, no mostraron una buena resistencia estable (French *et al.*, 1998).

El CIP en 1977 evaluó 11 entradas pertenecientes a 9 especies silvestres: *S. brachistotrichum*, *S. brachycarpum*, *S. hjertingii*, *S. huancabambense*, *S. lesteri*, *S. lignicaule*, *S. sogarandinum*, *S. sucrense* y *S. weberbaueri*, con la cepa CIP013 de la raza 3 colectada en Perú. Sólo *S. huancabambense* no presentó plantas marchitas. En tamizados previos, de 65 entradas pertenecientes a 33 especies diferentes, se seleccionaron 3 entradas de *S. demissum* y 2 de *S. jamesii* (CIP Annual Report, 1977).

Entre los años 1978 y 1979 cerca de 147 entradas pertenecientes a 63 especies silvestres fueron evaluadas en el CIP para su resistencia a MB. Las doce mejores especies resistentes después de la inoculación con la cepa CIP013 raza 3 fueron: *S. bulbocastanum*, *S. chacoense*, *S. demissum*, *S. jamesii*, *S. polytrichon*, *S. stenotomum*, *S. stoloniferum*, *S. sogarandinum*, y *S. sparsipilum*. Posteriores análisis incluyeron evaluaciones con cinco cepas diferentes de *R. solanacearum*: CIP052,

CIP092, CIP075, CIP048 y CIP03. Aunque no fue inmune, *S. jamesii* pareció poseer mejores niveles de resistencia a las cinco cepas, que las otras especies silvestres y fue usado por Hermesen en su programa de mejoramiento. Debido a su inmunidad al nematodo y que aparentemente soporta el calor de la zona tórrida, *S. sparsipilum* fue usado en los programas de mejoramiento del CIP (Martín, 1979). Además, se considera que esta especie es uno de los progenitores de las papas cultivadas tetraploides, lo cual facilitaría su uso en el mejoramiento de material con resistencia a la marchitez bacteriana (Schmiediche, 1984).

Desde 1979 se han proseguido las evaluaciones de clones que previamente fueron identificados como resistentes a la MB, conjuntamente con nuevos clones desarrollados por el CIP. Un grupo de 36 clones seleccionados por el CIP -con resistencia combinada a tizón tardío y a MB- fueron estudiados en seis ensayos de campo y uno en invernadero, evaluando la resistencia a tres aislamientos de *R. solanacearum* provenientes de la zona tórrida: CIP112 de Nepal, CIP122 de Ruanda y CIP165 de Sri Lanka. Las condiciones climáticas, la virulencia del patógeno y la presencia de nematodos, influyeron grandemente en la reacción de los clones al patógeno: 5 clones tuvieron buenos resultados en campo, pero ninguno de ellos tuvo buenos resultados en los 3 campos. A nivel de invernadero pocos clones fueron resistentes a 1 ó 2 cepas (CIP Annual Report, 1980).

Jackson & Gonzalez en 1979 lideraron una prueba del Centro Internacional de la Papa para resistencia a la raza 1 en Turrialba, Costa Rica, evaluando 4044 clones provenientes de 3 orígenes diferentes: Materiales de Wisconsin/CIP derivados de *S. phureja*, la colección de cultivares resistentes al tizón tardío de la papa de Toluca (México), y material de cruzamientos recientes para resistencia al MB y adaptación a las tierras bajas. Todas sucumbieron a la marchitez excepto 11 clones, pero sólo uno no presentó infección latente en los tubérculos: Mex Cruza 148/CIP 720118. El clon

Cruza 148, enviado por el Programa Mexicano de Papa, de pedigrí desconocido pero probablemente es una selección *S. tuberosum* x *S. demissum* (Montserrate x PI?) (Martin, 1979).

Bicamunpaka y Devaux en 1984 encontraron que Cruza 148 era la más resistente en pruebas en el este de África. Además, una moderada resistencia de esta variedad al Biovar 2A, fue confirmada en varios países del mundo: Venezuela, Costa Rica, Brasil, Perú, Bolivia, Indonesia, Filipinas, China, Kenya, Mauritius, Uganda, Rwanda, Burundi y Zaire (CIP Program Report, 1995; Delgado, 1995; French *et al.*, 1998). Este cultivar, al igual que la variedad Molinera, no desarrolla marchitez en condiciones frías, pero pueden diseminar el patógeno a través de sus tubérculos con alta tasa de infección latente (French *et al.*, 1998).

En 1986, en Wisconsin y el CIP se llevaron a cabo nuevos intentos para encontrar resistencia a *R. solanacearum*, para esto se evaluaron 1573 entradas pertenecientes a 102 especies de la colección de Sturgeon Bay, Wisconsin. Cada entrada fue probada como lotes de aproximadamente 50 semillas en bandejas con sustrato para "jiffy". Se obtuvieron tasas de sobrevivencia que variaban entre 0-100%. Las 41 entradas más resistentes incluyeron *S. acaule* (4), *S. berthaultii* (1), *S. boliviense* (1), *S. brachycarpum* (1) y *S. chacoense* (1), *S. commersonii* (3), *S. demissum* (19), *S. phureja* (6), *S. polytrichon* (2), *S. raphanifolium* (2) y *S. xblanco-galdosii* (1) (CIP, Informe Anual 86; CIP, Informe Anual 87). Otras especies reportadas como resistentes en las investigaciones realizadas por el CIP son *S. bulbocastanum*, *S. capsicibaccatum*, *S. curtilobum*, *S. jamessi*, *S. microdontum* y *S. stenotomum* (Martin & French, 1977; Martin, 1979 y Ochoa & Schmiediche, 1983). En ese mismo año, otro Inventario del Banco de Germoplasma de Sturgeon Bay, publicado por la Universidad de Wisconsin, reporta como nuevas fuentes de resistencia a las especies silvestres *S. chacoense*, *S. fendleri*, *S. microdontum*, *S. polyadenium*, *S. sparsipilum*, *S. tarijense*,

S. tuberosum subsp. andigena, *S. vernei* y algunos híbridos naturales (University of Wisconsin, 1986).

En EMBRAPA (Brasil) desde 1987 se evaluaron 1500 clones para resistencia a la MB. Este material que fue recibido del CIP, consistía de poblaciones que combinaban resistencia de entradas de *S. chacoense*, *S. microdontum*, *S. phureja* y *S. sparsipilum* (Schmiediche, 1988). Además, en ese mismo año se buscó una variedad que reemplazara a la variedad Achat (variedad con resistencia deseable a la MB, pero estéril y con pobres cualidades culinarias), por lo que se inició una selección de genotipos resistentes a la MB generados a partir de TPS, seleccionándose los mejores genotipos, y llegándose a desarrollar nuevos clones con alto nivel de resistencia a la MB. Entre ellos, MB-03 mostró resistencia a la raza 1 y 3. Sin embargo estos clones continúan transmitiendo la enfermedad a sus tubérculos (Lopes *et al.*, 1998).

En 1989, con la finalidad de identificar nuevas fuentes de resistencia, mas de 60 entradas, previamente evaluadas, fueron analizadas en la Universidad de Wisconsin, mediante la inoculación del tallo con 3 cepas de *R. solanacearum*. Se encontraron altos niveles de resistencia a las 3 cepas en *S. acaule* PI 498183, 498178, y 498081; *S. commersonii* PI 320267; y *S. demissum* PI 175423. Los genotipos seleccionados fueron usados posteriormente como fuentes de resistencia en experimentos de fusión de protoplastos con *S. tuberosum subsp. tuberosum* (CIP, Annual Report 1989).

Bamberg *et al* en 1994 reportan 58 entradas con conocida resistencia a la MB estas entradas pertenecen a las especies *S. acaule*, *S. berthaultii*, *S. boliviense*, *S. brachycarpum*, *S. chacoense*, *S. chomatophilum*, *S. commersonii*, *S. demissum*, *S. phureja*, *S. polytrichum*, *S. raphanifolium*, *S. stoloniferum* y *S. xblanco-galdosii*. En ese mismo año el Inventario de la Commonwealth Potato Collection vuelve a reportar como

resistentes las siguientes especies: *S. chacoense*, *S. microdontum*, *S. phureja*, *S. sparsipilum*, *S. stenotomum* spp. *stenotomum* Juz. Et Buky *S. stenotomum* spp. *goniocalix* Juz. Et Buk (Wilkinson et al., 1994).

Tradicionalmente, cuando se evaluaba la resistencia a la MB en varios cultivos hospederos de *R. solanacearum*, se tomaba como criterio de selección la proporción de plantas marchitas sobre la proporción de plantas sanas (Prior et al., 1994). En china, cuando el porcentaje de supervivencia estaba por encima de 80 ó 90%, el genotipo era considerado como resistente o altamente resistente (Li & Tan, 1984; Mehan & Liao, 1994). Esta definición pareció ser simple y práctica en el mejoramiento convencional. Los cultivares resistentes eran considerados libres del patógeno basados en el análisis visual de los síntomas de marchitez (Liao et al., 1998). Por esta razón, la mayoría de los genotipos resistentes a la MB han sido seleccionados teniendo en cuenta sólo la ausencia de síntomas de marchitez, y muy pocos investigadores han evaluado la infección latente tanto en tallos como en tubérculos. Debido a esto, la resistencia a la infección latente ha sido recomendada como un nuevo criterio importante para los mejoradores de papa (Priou et al., 2002).

El rendimiento de la resistencia a la MB parece ser inestable bajo diferentes condiciones ambientales. Varios estudios han mostrado que la temperatura alta es el factor más importante que causa la ruptura de la resistencia en papa (French & De lino, 1982). Además, la resistencia se expresa mejor con altas intensidades de luz a 24°C y 28°C, mientras que la disminución de la intensidad de luz y el foto período, reducen la resistencia en algunos clones (Sequeira & Rowe, 1969). Otro hecho importante es que se sospecha que la resistencia que se encuentra en las especies silvestres no sería de la misma naturaleza que la resistencia que se encontró anteriormente en *S. phureja*. Si se logra combinar la resistencia de varias fuentes, se van a obtener poblaciones, y al final variedades comerciales que tienen una

resistencia amplia que permite combatir la bacteria en toda su variabilidad inclusive en las zonas cálidas (Schmiediche, 1984).

2.4.2. Mejoramiento genético

Las especies silvestres de *Solanum* spp. utilizadas en programas de mejoramiento para resistencia a la MB han sido *S. acaule*, *S. bukasovii*, *S. boliviense*, *S. candolleanum*, *S. chacoense*, *S. coelestipetalum*, *S. commersonii*, *S. leptophyes*, *S. microdontum*, *S. multidissectum*, *S. peloquinianum*, *S. raphanifolium*, *S. sogarandinum*, *S. sparsipilum*, y las especies cultivadas *S. phureja*, *S. stenotomum* y *S. goniocalyx* (Shekhawat et al., 1980; CIP Annual Report, 1985; CIP Informe Anual 86-87; Jaworsky et al., 1987; French y Sequeira, 1988; Bamberg et al., 1994; Anguiz & Mendoza, 1997; Laferriere et al., 1998; Fock et al., 2005; Kim-Lee et al., 2005; Priou et al., 2005).

De estas todas estas fuentes de resistencia las más utilizadas actualmente son: los clones BR, MS y PSB derivados de *S. phureja*; el clon AVRDC 1287.19 derivado de *S. chacoense*. y *S. raphanifolium*; el clon mexicano Cruza 148, resistente a la MB y al “tizón tardío” de la papa; poblaciones diploides derivadas de las especies silvestres *S. chacoense*, *S. sparsipilum* y las especies nativas *S. goniocalyx*, *S. phureja* y *S. stenotomum*; y genotipos de *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* que son precoces, se adaptan bien al calor, tiene resistencia al tizón tardío y/o nemátodos, inmunidad al virus X e Y de la papa, alta producción y buenas características agronómicas (Schmiediche, 1985; Anguiz & Mendoza, 1997).

En el 2000, Fock et al., produjeron híbridos somáticos entre *S. phureja* y *S. tuberosum* que fueron evaluados usando cepas de la raza 1 y raza 3 procedentes de la Isla Reunión. Todos los híbridos excepto 2 fueron tolerantes a la raza 1 y

susceptibles a la raza 3. Un híbrido anfiploide mostró una buena tolerancia a ambas cepas.

En el 2005, Fock *et al.*, reportaron que híbridos somáticos entre *S. phureja* y *S. stenotomum* con papas cultivadas, resultaron en líneas con resistencia mejorada a la raza 1 de *R. solanacearum*. Se reportaron similares líneas resistentes a la raza 3 usando híbridos somáticos de *S. tuberosum* x *S. commersonii*, los cuales retuvieron la resistencia incluso a altas temperaturas. También se han hecho limitados esfuerzos para seleccionar material resistente a la MB a partir de la variación somática de papa *in vitro*.

En ese mismo año Kim-Lee *et al.*, produjeron híbridos somáticos entre *S. tuberosum* dihaploide y clones de *S. comersonii* resistentes a la MB. Luego de un retrocruzamiento 7 clones fueron resistentes o altamente resistentes a la raza 1 y 3 pero sólo 3 clones altamente resistentes fueron seleccionados para posteriores evaluaciones como cultivares o como materiales de mejoramiento.

Se han hecho grandes esfuerzos para transferir la resistencia genética a la MB procedentes de varios parientes silvestres. Desgraciadamente, híbridos de papa con los genotipos resistentes de *S. chacoense*, *S. multidissectum* y *S. sparsipilum*, mostraron una moderada resistencia y características de las especies silvestres (Boshou, 2004).

La especie *Solanum phureja* ha sido una fuente valiosa de resistencia a la MB, pero desafortunadamente se ha encontrado que esta resistencia es cepa-específica y sensible a la temperatura, ya que tiende a declinar bajo condiciones de altas temperaturas, y es más adecuada para grandes altitudes y climas fríos (Ciampi & Sequeira, 1980; French & De Lindo, 1982). Además, investigaciones sobre la

resistencia en *S. phureja* indicaron que los clones difieren en su reacción a las diferentes cepas de la bacteria (Sequeira y Rowe, 1969). Se encontraron clones con resistencia a 10 aislamientos, pero muchos de ellos fueron susceptibles a uno o más de los aislamientos siendo evidente la necesidad de muchos genes para conferir un amplio espectro de resistencia. El Programa de Mejoramiento del CIP mediante el uso de gametos no reducidos ($2n$), que ocurren con diferente frecuencia en todas las papas diploides cultivadas y silvestres, ha transferido los dos genomas de los clones resistentes de *S. phureja* a material tetraploide con buenas características agronómicas y alto rendimiento. Se ha logrado mantener la resistencia de los clones originales de *S. phureja* en el material tetraploide. Al mismo tiempo se ha incorporado la resistencia vertical y horizontal a *Phytophthora infestans*.

El material tetraploide de papa con resistencia a la MB y adaptado a temperaturas altas no tiene la estabilidad de resistencia deseada. Esto es debido probablemente, a que se dio mayor énfasis en la selección por adaptación al calor y atributos agronómicos deseables dejando de lado el entrecruzamiento con progenitores resistentes a MB. Esto habría ocasionado la pérdida gradual de la resistencia proveniente de los progenitores originales diploides. Asimismo, esta pérdida es agravada por la gran variabilidad de la bacteria y a su interacción con los otros patógenos.

Es conocido además que para obtener una resistencia estable a la MB es necesaria una base genética amplia de resistencia y adaptación al ambiente en particular donde se presenta las razas del patógeno (Thung *et al.*, 1990). Por otro lado, se ha demostrado exitosamente que las especies silvestres pueden ser usadas eficientemente y efectivamente en un tiempo relativamente corto si el grueso del trabajo de mejoramiento es llevado a un nivel diploide (Schmiediche, 1988)

Hasta ahora, el mejoramiento para resistencia a la MB ha dado como resultado niveles moderados de resistencia, que son muy útiles en programas de Manejo Integrado de Plagas. Sin embargo, aún es posible hacer mejoramiento con mayores niveles de resistencia, ya que existe complementariedad entre las diferentes fuentes de resistencia.

2.4.3. Selección masal para resistencia a *R. solanacearum*

Nielsen y Haynes (1960) evaluaron el cultivar *Solanum tuberosum* spp. *tuberosum* para resistencia a *R. solanacearum* mediante la infestación del suelo con una suspensión bacteriana estandarizada a 97-98% de transmitancia de luz. Después de cortar las raíces de la periferie de cada maceta, se adicionó con una jeringa 10 ml de la suspensión bacteriana a cada corte (Nielsen & Haynes, 1960).

Thurston y Lozano (1968) utilizaron el método de perforación del tallo en el proceso de inoculación de plantas de *S. phureja*. Una inoculación similar fue realizada por Valdez (1986) en plantas de tomate, cortando las hojas con el escalpelo previamente humedecido en el inóculo.

El método de perforación del tallo fue utilizado por Rowe y Sequeira (1970) en Wisconsin en los trabajos de mejoramiento y selección para resistencia a marchitez bacteriana, pero este método no es práctico para evaluar gran cantidad de material. El método de la selección masal más eficiente fue desarrollado por Gonzalez *et al.* (1973) que consiste en la siembra de semillas de papa, separadas 3.2 cm, en bandejas de 50 x 35 cm conteniendo una mezcla de substrato y regadas con agua desmineralizada. Las plantas crecieron por 20 días a 22°C y 14 horas de fotoperíodo. El riego fue suspendido por 2 días. Se cortaron las raíces de plantas de 3-5 cm de altura y fueron inoculadas con 51/ bandeja de una mezcla de dos cepas de *R. solanacearum* a una

densidad óptica de 0.5 a 600 nm (5×10^5 ufc/ml). Las plantas inoculadas fueron incubadas a 28°C por dos semanas. La marchitez se presentó a los 3-4 días y muchas plantas murieron después de los 4 días. Las plantas sobrevivientes fueron transplantadas a macetas de 10 cm en el invernadero, muchas marchitaron y otras desarrollaron y tuberizaron. Cuando las raíces no fueron cortadas, se necesitó más inoculo para lograr la marchitez (Gonzales *et al.*, 1973).

French (1986) comparó cinco métodos de inoculación utilizando 1×10^8 ufc/ml de la cepa CIP204 (Raza 3 peruana). Se utilizaron esquejes de la variedad susceptible Ticahuasi, los cuales fueron colocados en macetas plásticas de 1 dm³ de capacidad. Se utilizaron diez plantas por tratamiento, y la prueba fue repetida dos veces a temperaturas que promediaban 25,3°C y 27,6°C, respectivamente. Los cinco métodos evaluados fueron: infestación del suelo mojando el suelo alrededor del tallo con 40 ml de inoculo; perforación del tallo con una aguja de disección a través de una gota de inoculo en la axila de la tercera hoja antes del ápice; corte del foliolo terminal de la tercera hoja a partir del ápice con unas tijeras de disección sumergidas en el inoculo; infiltración del foliolo utilizando una jeringa descartable, y finalmente, espolvoreando carborundum de malla 600 sobre la cara superior de los foliolos y frotando las hojas con una mota de algodón humedecida con el inoculo. Los dos últimos métodos dieron resultados inconsistentes. El método de corte con tijeras tuvo la misma consistencia que el de perforación del tallo, pero el primero es más rápido de realizar que el segundo. Después de 12 días todas las plantas, con ambos métodos, estaban severamente marchitas. La infestación del suelo fue igualmente efectiva pero los síntomas demoraron en presentarse, a los doce días, 9 de 10 plantas tenían marchitez inicial (French, 1986).

En 1986, en Wisconsin y en el CIP, se realizaron nuevas pruebas para encontrar resistencia a *R. solanacearum* en especies silvestres de papa utilizando

semilla verdadera de papa (TPS). Para esto cada entrada fue evaluada como lotes de aproximadamente 50 semillas en bandejas con sustrato para "jiffy". Las plantas crecieron en un invernadero a 22°C. El suelo fue empapado con dm^3 de suspensión de las cepas CIP08 (raza 1) y CIP81 (raza 3) de *R. solanacearum* en concentraciones de 6×10^5 y 1.2×10^6 ufc/ml, respectivamente. Luego se introdujo un cuchillo entre las líneas para herir las raíces. Las plántulas fueron incubadas por 21 días a 28°C, obteniéndose tasa de sobrevivencia que variaban entre 0% y 100% (CIP, informe Anual 86-87).

La metodología que utiliza el CIP para el desarrollo de poblaciones resistentes en el invernadero (French y Nydegger, 1987) es una modificación del método de selección masal de Wisconsin, y consiste en sembrar 54 semillas de papa en bandejas de plástico (41 x 78 cm) conteniendo una mezcla de arena de río y musgo en la proporción de 1:2. La concentración de inóculo varía de 1×10^7 a 1×10^8 dependiendo de las pruebas preliminares con cada aislamiento. Se utiliza igual volumen para regar las bandejas con el inóculo las que no son regadas con agua el día de la inoculación.

En 1990, el CIP mejoró su técnica de selección masal para resistencia a MB. Plántulas provenientes de esquejes, mini tubérculos o semilla verdadera de papa (TPS) de las variedades Yungay y Ticahuasi, fueron transplantados en Jiffy-7 y se las dejaba crecer por 4 semanas. Luego, las raíces eran sumergidas en una suspensión acuosa del inóculo por 10 segundos. Las plantas eran evaluadas después de 4 días de incubación a 27-32°C y a partir de entonces se evaluaba cada 2 días durante 2 semanas. El desarrollo de los síntomas fue fuertemente influenciado por la concentración del inóculo ($5 \times 10^5 - 1 \times 10^8$ ufc/ml), el método de reproducción de las plantas y la edad fisiológica de los esquejes (CIP Annual Report, 1990).

Aley *et al.*, en 1994 desarrollaron un método de inoculación en invernadero para la selección de clones resistentes. Este método consistía en sembrar los esquejes apicales de las plantas de papa o los esquejes de los tubérculos brotados en macetas pequeñas conteniendo un sustrato. Cuando las plantas alcanzan aproximadamente 15 cm de altura se llevan al invernadero un día antes de la inoculación. Las condiciones del invernadero que favorecen el desarrollo de la enfermedad son $28\pm 4^{\circ}\text{C}$, y 85-90% H.R. Cada maceta, conteniendo una planta se inocula con 25 ml de suspensión bacteriana de *R. solanacearum* a 1×10^8 ufc/ml obteniéndose una concentración final de 1×10^8 ufc/g suelo. Se inoculan 20 plantas por genotipo. Las plantas se incuban durante 30 días y los índices de la enfermedad se registran cada semana en base a una escala de la cual se obtiene un índice de severidad. Los cultivares Cruza 148, Molinera, Revolución y Yungay se usan como testigos.

Actualmente el CIP utiliza este método con pequeñas adaptaciones que consisten en usar solo 10 plantas por genotipo, no utilizar macetas sino Jiffys strips y registrar la incidencia de la enfermedad mediante una escala de dos grados.

III. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

- Identificar genotipos de especies silvestres de papa que presenten altos niveles de resistencia a la marchitez bacteriana con énfasis a la resistencia a la infección en tubérculos causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum*.

2.2. Objetivos Específicos

- Seleccionar diferentes accesiones del germoplasma de especies silvestres de papa por su resistencia con la cepa CIP 204 (Filotipo II / Biovar 2A) de *Ralstonia solanacearum*.
- Evaluar la estabilidad de la resistencia de los genotipos seleccionados inoculándolos con 7 cepas del Biovar 2A procedentes de diferentes países de Latinoamérica.
- Determinar la resistencia a la infección visible y latente en tallos y tubérculos de los clones seleccionados usando las pruebas de ELISA-DAS y ELISA-NCM post-enriquecimiento para tallos y tubérculos respectivamente.
- Reproducir los genotipos resistentes y facilitar su conservación.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo se desarrolló en los laboratorios e invernaderos de las Áreas de Bacteriología y de Conservación y Caracterización de Recursos Genéticos del Centro Internacional de la Papa (CIP), que se encuentra a una altitud de 243,7 m.s.n.m., Latitud 12°05' S, Longitud 76°57' Oeste, Distrito de La Molina, Provincia y Departamento de Lima-Perú.

4.2. Material vegetal

El material biológico consistió en 113 especies, sub-especies y variedades diferentes de *Solanum spp.* Sección *Petota* del Banco de Germoplasma del Centro Internacional de la Papa (CIP) (Tabla 4). Dentro de este grupo se consideraron 177 genotipos pertenecientes a 21 entradas (13 especies diferentes) que fueron seleccionados por su resistencia al Tizón Tardío de la Papa (*Phytophthora infestans*) y fueron proporcionados por el Magíster Wilmer Pérez (CIP) (Tabla 5).

Se utilizaron como controles las variedades cultivadas:

- Revolución: susceptible
- Cruza 148: moderadamente resistente

Para la Prueba de Infección Latente en Tubérculos (Tercer Tamizado), también se consideraron como testigos 3 genotipos silvestres susceptibles pertenecientes a la especie silvestre *Solanum acaule* Bitter: bw020039 (Número de entrada: OCH 13545), bw020040 (Número de entrada: OCH 13545) y bw020135 (Número de entrada: OCHS 15609).

Tabla 4. Lista de Entradas evaluadas para su resistencia a la Marchitez Bacteriana de la Papa bajo condiciones de invernadero (28–32°C).

Número CIP	Número de Colector	Especie	Número de genotipos evaluados
761070	OCHS 11297	acg	15
760484	HAM 2	acl	7
760506	HAM 70	acl	14
760460	HHH 6617	acl	5
760213	HHCH 4243	acl	12
760267	HHCH 4582	acl	4
760277	HHCH 4588	acl	1
760316	HHCH 4854	acl	4
760339	HHCH 5071	acl	7
760346	HHCH 5081	acl	7
761129	OCH 8611	acl	9
761214	OCH 11322	acl	5
	OCH 11607a	acl	6
761380	OCH 11984	acl	5
761386	OCH 11990	acl	14
761404	OCH 12033	acl	1
761525	OCH 13175	acl	2
761624	OCH 13545	acl	13
761627	OCH 13555	acl	5
761803	OCH 13794	acl	10
761824	OCH 13819	acl	14
761832	OCH 13831	acl	13
761987	OCH 14315	acl	11
762432	OCH 15820	acl	9
762567	OCH 15825a	acl	9
762446	OCH 15835	acl	9
761288	OCHS 11825	acl	22
761289	OCHS 11826	acl	13
761290	OCHS 11829	acl	9
761292	OCHS 11831	acl	7
761509	OCHS 13146	acl	7
762140	OCHS 14926	acl	11
762141	OCHS 14927	acl	14
762145	OCHS 14931	acl	17
762150	OCHS 14936	acl	2
762194	OCHS 15059	acl	3
762197	OCHS 15062	acl	1
762297	OCHS 15465	acl	13
762341	OCHS 15609	acl	12
762821	SS 7202	acl	43
762865	SS 7245	acl	2
762873	SS 7253	acl	1
761450	OCH 12086b	acp	3
762964	SSTS 7345	acp	26
762967	SSTS 7348	acp	16
762968	SSTS 7349	acp	10
763008	OCH 2043	acs	2
760030	OCH S-86	acs	13
762868	SS 7248	acs	2
763615	OCHS 16174	adg	19
760014	OCH 2065	alb	4

Tabla 4 (continuación)

Número CIP	Número de Colector	Especie	Número de genotipos evaluados
762534	OCH 12084a	alb	5
761452	OCH 12089	alb	3
760010	OCH S-21	alb	2
760028	OCH S-79	alb	4
762917	SSTH 7399	alb	8
762937	SSTS 7318	alb	3
762938	SSTS 7319	alb	5
762949	SSTS 7330	alb	1
762957	SSTS 7338	alb	1
760469	HHA 6657	aln	76
760019	OCH S-59	amb	10
763647	OCHS 16261	amy	8
762927	SSTS 7308	amy	19
762820	SS 7201	ark	18
762843	SS 7223	ark	31
762692	HAO 126	ast	12
763065	EBS 1906	aut	1
763018	HAW 2463	aut	1
760415	HUA 70-306	aut	1
762256	OCHS 15205	aut	1
760433	HHA 6521	avl	12
763124	HHR 3780	bal	22
763679	OKA 4366	bal	9
763708	OKA 5700	bal	32
763727	OKA 7610	bal	8
763728	OKA 7614	bal	20
763729	OKA 7635	bal	8
762503	ALN 64-02	ber	41
760519	HAM 141	ber	4
760236	HCH 4422	ber	8
760248	HHCH 4531c	ber	8
760257	HHCH 4543	ber	15
760259	HHCH 4562	ber	3
760304	HHCH 4727	ber	1
760305	HHCH 4728	ber	3
760310	HHCH 4746	ber	1
761390	OCH 12008	ber	4
762329	OCHC 15578	ber	1
762926	SSTS 7307	bhk	23
761896	OCH 14162	blb	8
761891	OCH 14163	blb	26
761933	OCH 14215	blb	9
762958	SSTS 7339	blg	2
762962	SSTS 7343	blg	2
761888	OCH 14142	blb	2
761898	OCH 14164	blb	17
763835	TARN 153	blb	11
761466	OCH 13009	blg	1
760498	HAM 47	blv	19
762519	OCH 11933	blv	12
760428	HHA 6468	brc	5

Tabla 4 (continuación)

Número CIP	Número de Colector	Especie	Número de genotipos evaluados
760462	HHH 6620	brc	10
760245	HHCH 4498	brc	8
763144	HOHL 189	brc	2
763145	HOHL 196	brc	1
762304	OCHS 15497	brc	4
762855	SS 7235	bue	2
763053	CORS P 223	buk	2
762554	CUNASPUQUIO	buk	3
762499	EBS 1825	buk	2
762657	HHCH 5063a	buk	2
760341	HHCH 5074	buk	1
762661	HHCH 5076	buk	3
762672	HJT 5444	buk	2
762550	HJT 5575	buk	3
763133	HJT 5902	buk	2
760368	HJTCH 5107	buk	3
763009	HVHL 5487	buk	1
761126	OCH 8083	buk	10
761136	OCH 9088	buk	7
761137	OCH 9089	buk	4
760015	OCH S-33	buk	2
762510	OCH S-7	buk	5
763217	OCH 11330a	buk	7
762990	OCH 11331a	buk	7
761222	OCH 11333	buk	4
761576	OCH 13281	buk	7
761621	OCH 13542	buk	3
761622	OCH 13543	buk	2
763288	OCH 13564b	buk	9
761717	OCH 13676	buk	11
761739	OCH 13696	buk	2
761806	OCH 13798	buk	4
701831	OCH 13830	buk	2
761954	OCH 14275	buk	10
761983	OCH 14309	buk	6
762042	OCH 14401	buk	7
760004	OCH S- 8	buk	1
760012	OCH S-28	buk	6
761192	OCHS 11293	buk	11
761202	OCHS 11306	buk	3
762683	OCHS 12595	buk	10
761480	OCHS 13032	buk	1
762086	OCHS 14673	buk	7
763006	OCHS 16266	buk	1
763650	OCHS 16267	buk	9
762831	SS 7212	buk	11
762839	SS 7219	buk	9
762924	SSTS 7305	buk	22
760435	HHH 6532	cap	7
761030	OCHS 11915	cap	8
762303	OCHS 15489	cap	6

Tabla 4 (continuación)

Número CIP	Número de Colector	Especie	Número de genotipos evaluados
760645	HOFF 1533	chc	13
761399	OCH 12026	chc	7
762276	OCH 15274a	chc	5
762859	SS 7239	chi	13
761590	OCH 13350	chl	17
761269	OCH 11753a	chm	1
763609	OCHS 16060	chm	1
761180	OCHS 11250	chn	4
761588	OCH 13345	chq	11
761870	OCH 13963	chq	13
762553	OCHS 12543	chq	3
762573	OCHS 12566	chq	11
761870	OCHS 13963	chq	7
762940	SSTS 7321	chq	5
762944	SSTS 7325	chq	1
762950	SSTS 7381	chq	7
762608	OCHS 16063	cjm	5
762616	OCHS 16118	cjm	12
762617	OCHS 16119	cjm	8
762619	OCHS 16121	cjm	9
762620	OCHS 16122	cjm	8
762621	OCHS 16123	cjm	2
761080	FB 4001	cmm	18
761082	FB 4004	cmm	3
761084	FB 4005 ^a	cmm	5
761086	FB 4008	cmm	1
761087	FB 4010	cmm	6
761088	FB 4011	cmm	3
761089	FB 4014	cmm	6
761090	FB 4025 ^a	cmm	2
761092	FB 4025C1.12	cmm	13
761093	FB 4025C12.1	cmm	8
761094	FB 4025C22.4	cmm	2
761097	FB 4025C50.1	cmm	10
761101	FB 5078	cmm	9
761102	FB 5079.1	cmm	6
761103	FB 5079.2	cmm	5
761104	FB 5080	cmm	7
472837	OKA 5174x5207	cmm	52
762454	URY 4	cmm	4
762458	URY 8	cmm	6
762459	URY 9	cmm	2
762461	URY 11	cmm	4
762462	URY 12	cmm	5
762464	URY 14	cmm	4
762468	URY 22	cmm	15
762469	URY 23	cmm	5
762470	URY 24	cmm	2
762471	URY 25	cmm	6
762473	URY 29	cmm	5
762475	URY 31	cmm	9

Tabla 4 (continuación)

Número CIP	Número de Colector	Especie	Número de genotipos evaluados
762476	URY 32	cmm	5
762477	URY s.n.	cmm	1
763013	HOHL 211	cnd	4
761338	OCHS 11897	cnd	2
762185	OCHS 15011	cnd	1
763014	ZAV 1597	cnd	15
762129	OCHL 14826	cnt	4
762241	OCHS 15159	cnt	9
762886	SSTH 7368	cnt	3
762481	OCH 7710	cop	1
761122	OCH 7728	cop	3
761715	OCH 13674	cop	6
761991	OCH 14326	cop	7
762002	OCH 14348	cop	7
762371	OCHS 15664	cop	4
760451	HHA 6581	crc	8
761281	OCHS 11806	crc	24
761344	OCHS 11909	crc	8
763626	OCHS 16210a	dcm	1
762972	SSTS 7353	dcm	16
762973	SSTS 7354	dcm	3
760253	HCH 4534	dds	32
760307	HHCH 4736	dds	17
	COR 14237	dms	102
761876	OCH 14101	dms	17
761893	OCH 14154	dms	18
761048	OCH 14161	dms	1
761050	OCH 14218	dms	43
760664	TARN 136	dms	7
760665	TARN 137	dms	8
760660	TARN 64	dms	8
761878	OCH 14106	flh	9
761391	OCH 12010	gnd	9
762331	OCHS 15588	gnd	24
762686	OCHS 12559	gra	5
762263	OCHS 15240	gra	7
761498	OCH 13117	grc	6
762634	OCHS 15989	gzm	1
760955	HUA 966	hcb	2
761259	OCH 11692	hcr	1
761204	OCHS 11308	hcr	7
762104	OCHS 14715	hcr	2
762111	OCHS 14731	hcr	1
762928	SSTS 7309	hcv	4
761899	OCH 14168	hou	14
761901	OCH 14171	hou	7
761902	OCH 14172	hou	11
763015	HAO 160	hps	5
763016	HAO 161 b	hps	16
762906	SSTH 7388	hro	24
762930	SSTS 7311	hro	9

Tabla 4 (continuación)

Número CIP	Número de Colector	Especie	Número de genotipos evaluados
762943	SSTS 7324	hsf	15
762948	SSTS 7329	hsf	10
762959	SSTS 7340	hst	1
761359	OCH 11941	ifd	7
761003	OCH 11966	ifd	13
761374	OCH 11973	ifd	2
761004	OCH 11977	ifd	5
761212	OCH 11317	lgl	12
761947	OCH 14268	inc	11
761143	OCHS 9833	inc	6
763730	OKA 7639	inm	4
762854	SS 7234	ins	5
761895	OCH 14159	iop	10
761254	OCH 11667	irs	1
762779	BAM 5	jam	10
763368	OCH 14782	jlc	2
762830	SS 7211	lgl	1
762842	SS 7222	lgl	4
761967	OCH 14288	lmb	3
761968	OCH 14290	lmb	7
761970	OCH 14292	lmb	11
762552	OCHS 12594	lmb	2
762336	OCHS 15601	lmb	9
762824	SS 7205	lmb	13
762673	AST 92	lph	5
760487	HAM 12	lph	2
763089	HAO 85a	lph	1
763094	HAO 128	lph	9
760326	HHCH 5026b	lph	3
760328	HHCH 5028	lph	1
760673	HOFF 1712	lph	7
760675	HOFF 1832	lph	1
763147	HOHL 230	lph	8
763148	HOHL 236	lph	2
763149	HOHL 242	lph	4
763017	HOHL 249	lph	1
763022	HOHL 265	lph	1
763024	HOHL 270	lph	4
761156	OCH 10876	lph	17
761766	OCH 13730	lph	2
760678	OKA 3801	lph	1
760684	OKA 4300	lph	1
760694	OKA 4560	lph	7
760679	OKA 3802	lph	1
761691	OCH 13640	lxs	6
762952	SSTS 7333	mac	2
761485	OCH 13066	mag	7
760530	HAM 175	mcd	35
760531	HAM 176	mcd	2
760532	HAM 180	mcd	7
760534	HAM 187	mcd	16

Tabla 4 (continuación)

Número CIP	Número de Colector	Especie	Número de genotipos evaluados
760430	HHA 6502	mcd	4
760466	HHA 6650	mcd	29
760467	HHA 6652	mcd	10
762505	HHR 3681	mcd	12
762314	OCHS 15534	mcd	24
762315	OCHS 15540	mcd	9
762318	OCHS 15545	mcd	14
762320	OCHS 15552	mcd	5
761273	OCHS 11767	med	5
760535	HAM 200	mga	16
760279	HCH 4590	mga	2
760278	HHCH 4589	mga	4
760334	HHCH 5058	mga	1
761109	OCH 7609	mga	117
762669	OCH 11941a	mga	12
761403	OCH 12032	mga	27
760001	OCH 37	mlt	1
761491	OCH 13110	mlt	12
761523	OCH 13173	mlt	3
761527	OCH 13177	mlt	2
760354	HHCH 5126	mrn	6
761678	OCH 13620	mrn	4
761714	OCH 13673	mrn	4
761774	OCH 13737	mrn	5
762828	SS 7209	mrn	3
762877	SS 7256	mrn	2
762398	OCHB 15698	mrn	12
761199	OCHS 11303	mtp	5
761424	OCHS 12057	mtp	3
	OCHS 12599	mtp	1
762094	OCHS 14688	mtp	1
762419	OCHS 15739	mtp	2
762977	SSTS 7358	mtp	4
762978	SSTS 7359	mtp	2
763261	OCH 13269a	mtp	5
760452	HHA 6585	oka	6
762302	OCHS 15488	oka	1
763083	HAO 50	opl	1
763093	HAO 125	opl	1
760292	HCH 4615	opl	14
760266	HHCH 4580	opl	28
760302	HHCH 4725	opl	2
761352	OCH 11927	opl	4
761370	OCH 11969	opl	13
761372	OCH 11971	opl	4
763704	OKA 5477	opl	1
763724	OKA 7588a	opl	2
761468	OCH 13011	orp	2
761476	OCH 13021	orp	18
761477	OCH 13022	orp	7
761478	OCH 13023	orp	1

Tabla 4 (continuación)

Número CIP	Número de Colector	Especie	Número de genotipos evaluados
762974	SSTS 7355	orp	4
763025	EBS 1894	pam	5
763322	OCH 13809a	pam	5
762861	SS 7241	pam	18
760362	HHCH 5230	pam	5
761247	OCH 11634	pcs	1
761911	OCH 14187	pld	4
760724	TARN 173a	pld	3
762537	OCH 13651	pll	4
762840	SS 7220	pll	3
762955	SSTS 7336	plq	2
762956	SSTS 7337	plq	2
761905	OCH 14179	pnt	2
760722	TARN 205a	pnt	2
761174	OCH 11159	prm	8
762874	SS 7254	prp	8
761868	OCH 13959	pur	19
761072	OCHS 11615	pur	9
760349	HJTCH 5097	rap	1
760355	HJTCH 5141	rap	1
761113	OCH 7613	rap	102
761127	OCH 8333	rap	1
761633	OCH 13563	rap	2
761635	OCH 13564a	rap	4
761645	OCH 13577	rap	8
761646	OCH 13578	rap	10
761655	OCH 13587	rap	12
761666	OCH 13604a	rap	12
761700	OCH 13658	rap	6
761742	OCH 13703	rap	5
761744	OCH 13705	rap	1
762705	OCHB 15700a	rap	4
762358	OCHS 15630	rap	14
762826	SS 7207	rap	18
762827	SS 7208	rap	4
762020	OCH 14379	rap.	11
761863	OCH 13947	raq	14
761864	OCH 13950	raq	16
762857	SS 7237	san	2
	SS 7237x7228	san	2
762942	SSTS 7323	sbn	6
760020	OCH S-60	scb	5
763042	AST 76	scr	10
760511	HAM 88	scr	14
760523	HAM 157	scr	10
763086	HAO 65	scr	9
763091	HAO 114	scr	19
760269	HHCH 4584	scr	15
761471	OCH 13013a	sgr	5
761586	OCH 13336	sgr	10
760018	OCH S-54	sgr	1

Tabla 4 (continuación)

Número CIP	Número de Colector	Especie	Número de genotipos evaluados
762904	SSTH 7386	sgr	1
762945	SSTS 7326	sgr	8
762947	SSTS 7328	sgr	19
762951	SSTS 7332	sgr	10
762954	SSTS 7335	sgr	8
762233	OCHS 15147	smp	3
762871	SS 7261	snd	2
761928	OCH 14208	snk	4
763121	HHR 3518	spg	3
763132	HJT 1893	spg	6
763138	HOFF 1754	spg	3
763674	OKA 4056	spg	5
763675	OKA 4268	spg	9
763703	OKA 4930	spg	6
763781	SHGRF 4104	sph	4
763859	TRHRG 208	sph	8
763860	TRHRG 215	sph	22
763861	TRHRG 219	sph	15
763054	CORSV P 231	spl	8
763057	CUS 0494002	spl	40
763058	CUS 0494003	spl	1
763059	CUS 0495020	spl	3
760237	HCH 4424	spl	10
760239	HCH 4428	spl	8
760421	HHA 6434	spl	15
760455	HHA 6597	spl	9
760475	HHA 6669a	spl	9
760230	HHCH 4399	spl	7
760232	HHCH 4414	spl	8
760235	HHCH 4419	spl	1
760242	HHCH 4476	spl	8
760290	HHCH 4600	spl	4
760360	HHCH 5226	spl	5
763191	OCH 2064a	spl	6
761357	OCH 11939	spl	3
761361	OCH 11946	spl	4
761740	OCH 13697	spl	4
761001	OCHS 11911	spl	10
762293	OCHS 15451	spl	1
762309	OCHS 15522	spl	10
762832	SS 7213	spl	17
762780	BAM 1	sto	13
762778	BAM 2	sto	18
762781	BAM 8	sto	8
762782	BAM 9	sto	18
763103	HAW 1230	sto	16
761884	OCH 14135	sto	10
761062	OCH 14145	sto	16
761918	OCH 14196	sto	12
761922	OCH 14201	sto	10
761017	OCH 14207	sto	6

Tabla 4 (continuación)

Número CIP	Número de Colector	Especie	Número de genotipos evaluados
762761	SBV 4	sto	6
762763	SBV 6	sto	10
762768	SBV 13	sto	3
762772	SBV 19	sto	6
763782	SHGRF 4237	sto	10
763783	SHGRF 4239	sto	1
760738	TARN 187	sto	9
763853	TRHRG 6	sto	6
763854	TRHRG 9	sto	2
762856	SS 7236	swy	12
762858	SS 7238	swy	22
762507	HOFF 1890	tar	1
762511	HOFF 2017	tar	1
761005	OCH 11993	tar	2
761006	OCH 11994	tar	10
761007	OCH 12001	tar	11
762330	OCHS 15584	tar	18
760515	HAM 117	tar.	1
762866	SS 7246	tcn	3
760224	HCH 4323	tor	11
760258	HCH 4556	tor	4
760295	HCH 4695	tor	15
760454	HHA 6589	tor	4
760458	HHA 6613	tor	3
760459	HHA 6616	tor	9
760312	HHCH 4758	tor	14
731458	OCHJ 12098	tor	1
762825	SS 7206	tor	5
762833	SS 7214	trp	11
762834	SS 7215	trp	17
762835	SS 7216	trp	9
762711	HAW 2547	tuq	1
763026	HOHL 288	ugt	5
763027	HOHL 290	ugt	5
761676	OCH 13614	uru	4
761795	OCH 13778	uru	1
761044	OCH 13781	uru	6
762223	OCH 15113	uru	7
762845	SS 7225	uru	4
761796	OCH 13778a	vel	14
763029	HAW 1528	ver	5
760746	TARN 91f	ver	5
763858	TRHRG 197	ver	1
760674	HOFF 1716	vid	7
760760	HOFF 1725	vid	2
761363	OCH 11952	vid	2
760676	OKA 3047	vid	1
763665	OKA 3808	vid	2
763711	OKA 5856	vid	5
763716	OKA 6829	vid	1
760563	VSOA 7	vio	11

Tabla 4 (continuación)

Número CIP	Número de Colector	Especie	Número de genotipos evaluados
762540	ROS 6	vlr	6
762860	SS 7240	vlr	6
763080	HAO 22	vrn	6
763122	HHR 3542	vrn	10
763709	OKA 5702	vrn	2
763710	OKA 5855	vrn	10
763712	OKA 5917	vrn	15
763718	OKA 7502	vrn	4
763252	OCH 13187a	wtm	5
761570	OCH 13271	wtm	8
762087	OCHS 14674	wtm	5
762910	SSTH 7392	wtm	25
762913	SSTH 7395	wtm	11
761328	OCH 11886	wtm	6
761251	OCHS 11639	wtm	8
763883	OCHS 15027	yan	12
762823	SS 7204	yun	3
763044	CAR 61	und	2
763045	CCC 405	und	1
763101	HAW 1108	und	61
760340	HHCH 5072	und	1
Total	531	113	4472

Especie: Ver lista de acrónimos (Anexo 10.1)

Tabla 5. Lista de Entradas (accesiones) con resistencia al Tizon Tardío evaluadas para su resistencia a la Marchitez Bacteriana de la Papa bajo condiciones de invernadero (28–32°C).

Número CIP	Número de Colector	Acrónimo	Número de Genotipos Evaluados
761030	OCHS 11915	cap	3
761399	OCH 12026	chc	2
761870	OCH 13963	chq	4
762573	OCHS 12566	chq	4
762616	OCHS 16118	cjm	7
762619	OCHS 16121	cjm	1
762454	URY 4	cmm	1
762475	URY 31	cmm	5
762185	OCHS 15011	cnd	1
761893	OCH 14154	dms	18
761050	OCH 14218	dms	43
761899	OCH 14168	hou	14
761902	OCH 14172	hou	2
760531	HAM 176	mcd	2
760534	HAM 187	mcd	16
762314	OCHS 15534	mcd	6
760535	HAM 200	mga	16
761403	OCH 12032	mga	19
761586	OCH 13336	sgr	4
761928	OCH 14208	snk	4
761062	OCH 14145	sto	5
Total	21	13	177

Acrónimo: Ver lista de acrónimos (Anexo 10.1).

4.2.1. Selección de las accesiones y codificación de los genotipos

Se tomaron diferentes entradas de especies silvestres del Banco de Germoplasma del CIP y se seleccionaron las entradas que tenían más de 10 tubérculos por planta, para generar los genotipos los cuales fueron codificados en orden ascendente.

4.2.2. Siembra y transplante de los genotipos

Una vez codificados, todos los genotipos fueron sembrados en macetas de 8" conteniendo aproximadamente 300 gramos de sustrato PROMIX Bx, (Premiers Brands, INC, Stanford, Canadá), un sustrato con el que se obtienen los mejores resultados. Cuando las plantas alcanzaron 5 cm de altura, 10 plantas por cada genotipo fueron transplantadas a Jiffys strips conteniendo 25 g de sustrato PROMIX Bx.

Después de 15 días del transplante, cuando las plantas habían alcanzado entre 15-20 cm de altura y un adecuado desarrollo de la raíz, fueron colocadas en el invernadero a una temperatura promedio de 27-30° C y una humedad relativa de 85-90%, con la finalidad de favorecer el desarrollo de los síntomas de la MB (Figura 7).

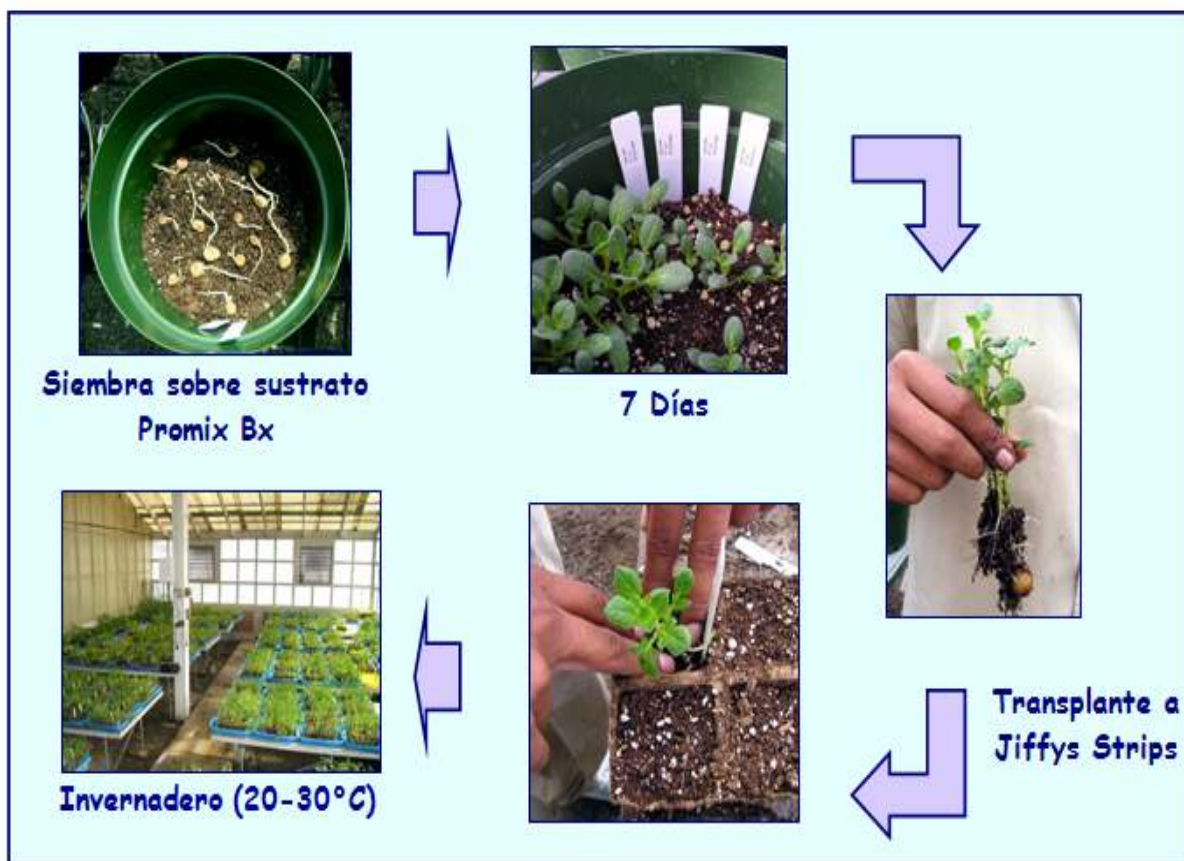


Figura 7. Siembra y transplante de genotipos de especies silvestre para evaluar la resistencia a la Marchitez Bacteriana de la Papa bajo condiciones de invernadero (20-30°C).

4.3. Primer Tamizado: Evaluación de la resistencia a la cepa CIP204 Filotipo II/ Biovar 2A/Raza 3 de *R. solanacearum*.

Para el Primer tamizado se utilizó la cepa CIP204 Raza 3/Biovar 2A, procedente del Departamento de Cajamarca (Perú), a una concentración de 1×10^8 ufc/g de suelo.

4.3.1. Prueba de patogenicidad

Para confirmar la patogenicidad de las cepas utilizadas, éstas previamente fueron inoculadas en plantas de papa de 15 cm de altura, inyectando 20 µl (o sea una gota) de una suspensión bacteriana purificada de *R. solanacearum* procedente de un cultivo en medio Kelman sin tetrazolium (TZC) (Anexo 10.2), a una concentración aproximada de 10⁸ ufc/ml. Se utilizó una jeringa de propileno de un milímetro y con una aguja hipodérmica. Las plántulas fueron colocadas en un invernadero con condiciones medioambientales que favorecen el desarrollo de la enfermedad: 28 ± 4°C, humedad relativa de 80-90%, y luz natural. La marchitez de las plántulas se inició en menos de una semana (entre 4 -5 días después de la inoculación). Una vez que aparecieron los síntomas, se procedió a realizar la prueba del flujo vascular y aislar nuevamente el agente patógeno.

Para el aislamiento, se sembró 20 µl de la suspensión bacteriana obtenida en la prueba del flujo vascular, en medio Kelman modificado (TZC con solo 2,5 g de dextrosa). Después de 48 horas de incubación a 30°C, las colonias fluidas y ligeramente rojizas de *R. solanacearum* se distinguieron fácilmente de otras bacterias saprofitas (colonias redondeadas y de color rojo oscuro). Las colonias de *R. solanacearum* fueron nuevamente sembradas en medio Kelman sin TZC y llevadas a incubación a 30°C por 48 horas para la multiplicación de la bacteria.

4.3.2. Estandarización del Inóculo

Después de las 48 horas de incubación, se agregó de 10 a 15 ml de agua destilada y se procedió al lavado con hisopos estériles para obtener la suspensión bacteriana, la cual fue colocada en beakers de 1000 ml y luego se procedió a la estandarización del inóculo.

La suspensión bacteriana fue estandarizada en el espectrofotómetro (Bausch & Lomb) a una longitud de onda de 600 nm. Una densidad óptica (DO) de 0,1 de absorbancia, fue equivalente a una concentración aproximada de 2×10^8 ufc/ml.

4.3.3. Infestación del Suelo

Todas las plantas fueron inoculadas vertiendo sobre el sustrato 25 ml de la suspensión bacteriana de *Ralstonia solanacearum* CIP204, para obtener una concentración final de 10^8 ufc/g de suelo (Figura 8).

4.3.4. Evaluaciones de los síntomas de marchitez

Las evaluaciones de los síntomas de la marchitez en el follaje se realizaron a intervalos de 7 días, durante un mes, registrándose adecuadamente los datos en hojas de evaluación preparadas para ello. Los tallos de los genotipos que no mostraron síntomas, fueron analizados mediante ELISA-DAS Post- enriquecimiento (Priou, 2004b) para detectar la infección latente en tallos.

La multiplicación de los tubérculos de los genotipos resistentes se realizó en la estación CIP-La Molina, durante los meses julio a diciembre y en la estación CIP-Huancayo, durante los meses de enero a junio en los años 2004-2005.

4.3.5. Confirmación de los síntomas

La confirmación de los síntomas de la enfermedad se realizó mediante la prueba de flujo vascular, para lo cual se tomó un pedazo (de 2 a 3 cm de largo) de la base del tallo de la planta con síntomas, luego se le colocó en forma vertical (sosteniéndolo con ayuda de un clip abierto) en un tubo de ensayo con agua destilada

y se espero unos minutos hasta observar los filamentos finos y lechosos que salen del extremo inferior del tallo cuando la planta se encuentra infectada por la bacteria *R. solanacearum*. La presencia de la bacteria en la prueba de flujo fue corroborada a través del aislamiento en medio Kelman modificado con TZC.

4.3.6. Análisis de infección latente en tallos mediante ELISA-DAS

Las plantas asintomáticas fueron sometidas a la prueba de inmunodiagnóstico ELISA-DAS desarrollado en el CIP (Priou *et al.*, 1999d) para detectar de esta manera la infección latente en las plantas de papa.

4.3.6.1. Preparación de las muestras:

Extracción de las muestras

Los tallos a evaluar fueron cortados (3 cm) con una tijera (flameada con alcohol). Posteriormente las muestras fueron colocadas en una bolsa de plástico de primer uso, se pesó el material y se maceró con la ayuda de un mazo de madera luego se añadió 3 ml de una solución tampón citrato estéril (3 ml por g de material vegetal) (Figura 8).

Proceso de enriquecimiento

Para el proceso de enriquecimiento se colocó 500µl del extracto de la muestra en 500µl de SMSA 1X (Anexo 10.3) colocados en tubos Eppendorf estériles de 1,5 ml y se incubaron durante 48 horas a 30° C en agitación constante (170 rpm).

4.3.6.2. Prueba serológica

Para esta prueba serológica se utilizaron placas de microtitulación de poliestireno como soporte para las muestras y los reactivos empleados, las cuales fueron sensibilizadas añadiendo 125µl de la solución de cobertura a cada hoyo de las placas de microtitulación. Luego se selló la placa con un parafilm para evitar la evaporación y se incubó a 37°C durante 4 horas para permitir que las moléculas de IgG se adhirieran a la superficie de los hoyos en la placa.

Se descartó la solución de cobertura de las placas de microtitulación y se procedió al lavado de la placa con tampón de lavado (Anexo 10.4) de la siguiente manera: Primero se llenó los hoyos con el tampón luego se esperó de 3 a 4 minutos, posteriormente se vació la placa y se repitió el mismo procedimiento 3 veces. Después del último lavado se puso la placa invertida sobre un papel toalla y se golpeó varias veces para retirar el tampón.

Luego, según un plan, se dispuso las muestras de tallos en la placa previamente sensibilizada para que las muestras de tallos y los controles puedan ser identificados fácilmente. Con una micropipeta, se transfirió 125µl de las muestras de tallos enriquecidos a cada uno de los hoyos de la placa de microtitulación. Posteriormente, se adicionaron los controles positivos: suspensiones hervidas de *R. solanacearum* en tampón citrato a las concentraciones de 10^8 , 10^7 , 10^6 y 10^5 ; y los controles negativos: extracto enriquecido de suelo libre de *Ralstonia solanacearum*, para cada placa. Se selló la placa con un parafilm y se incubó a 4°C en una refrigeradora doméstica durante 18 horas (de preferencia se dejó incubar durante toda la noche).

Luego de la incubación, se procedió a hacer los lavados siguiendo el mismo procedimiento que se utilizó para lavar la solución de cobertura. Después de descartar el último tampón de lavado, se añadió 125µl de la solución de conjugado (Anexo 10.4) a cada hoyo de la placa. Se selló la placa con parafilm y se incubó a 37°C durante 4 horas.

Para el desarrollo de la coloración se mezcló 2.5ml del tampón sustrato (Anexo 10.4) con 10 ml de agua destilada. Se mezcló bien y se ajustó el pH a 9.8 cuando fue necesario. Luego se descartó la solución del conjugado de las placas y se lavó la placa con tampón de lavado 3 veces como se describió anteriormente. Durante el último lavado se disolvió una tableta de 5 mg del sustrato p-nitrofenil fosfato en 12.5 ml del tampón sustrato. Luego de descartar el último tampón de lavado, se añadió 125µl de la solución de revelado de color (ver anexo) a cada hoyo de la placa. Posteriormente se dejó la placa a temperatura ambiente durante 60 minutos (20-25°C) para el desarrollo de la coloración.

En las muestras positivas, la reacción enzimática produce una coloración amarilla que varía en intensidad de claro a oscuro, dependiendo de la concentración de *R. solanacearum* en las muestras. El color fue medido mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm. Las muestras fueron consideradas positivas si la absorbancia era tres veces superior al promedio de la solución de suelo enriquecida libre de *R. solanacearum* usada como control negativo.

Para este tamizado se consideró como resistentes a aquellos genotipos que presentaron 0% de síntomas de marchitez bacteriana. Estos genotipos resistentes fueron multiplicados para evaluar la estabilidad de la resistencia con 7 cepas de *R. solanacearum*.



Figura 8. a) y b) Inoculación de cepas de *R. solanacearum* bajo condiciones de invernadero; c) y d) Toma de las muestras para la Prueba DAS-ELISA.

4.4. Segundo tamizado: Evaluación de la estabilidad de la resistencia con 7 cepas de *R. solanacearum* Filotipo II / Biovar 2A / Raza 3

Los genotipos seleccionados por su resistencia a la cepa CIP204, fueron inoculados con 7 cepas de la bacteria *R. solanacearum* Filotipo II / Biovar 2A / Raza 3 de la Colección del CIP procedentes de diferentes países de América Latina: CIP076,

CIP163, CIP204, CIP261, CIP 311, CIP372 y CIP434 (Tabla 6), a dos concentraciones: 5×10^7 ufc/g de suelo y 1×10^8 ufc/g de suelo, bajo las mismas condiciones de la primera inoculación.

Tabla 6. Cepas de *R. solanacearum* utilizadas en el Segundo Tamizado

Cepa	Raza	Biovar	Hospedero	Localidad	País	Año	Colector
CIP434	3	2	Papa	Tarija, San Andrés	Bolivia	1992	V.Alvarez
CIP163	3	2	Papa	Rionegro, Antioquia	Colombia	1980	C. Martin
CIP372	3	2	Papa	Colombia	Colombia	1989	O.Hidalgo
CIP076	3	2	Papa	Chalaco, Piura	Perú	1976	E.French
CIP204	3	2	Papa	Huambos, Cajamarca	Perú	1982	E.French
CIP311	3	2	Papa	Obraje, Carhuaz	Perú	1988	P. Aley
CIP261	3	2	Papa	Bailadores, Mérida	Venezuela	1984	R.Wissar

Las evaluaciones de la presencia de síntomas de marchitez se realizaron a intervalos de 7 días, durante un mes. Los tallos de los genotipos sin síntomas al final del mes, fueron analizados mediante ELISA-DAS Post- enriquecimiento para detectar la infección latente en tallos (Priou, 2004a). Los genotipos resistentes a por lo menos 5 de las 7 cepas en ambas dosis, fueron multiplicados para la prueba de Infección Latente en Tubérculos.

4.5. Tercer tamizado: Prueba de Infección Latente en Tubérculos con la cepa CIP204 Filotipo II / Biovar 2A / Raza 3 de *R. solanacearum*.

Las plantas fueron transplantadas a macetas de 8" conteniendo 400 gramos de sustrato PROMIX Bx. Después de 15 días del transplante, fueron llevadas a un tinglado a condiciones ambientales y se inocularon con 100 ml de una suspensión bacteriana de *R. solanacearum* CIP204. El inóculo poseía una concentración tal que al final se obtenía una concentración final de 5×10^7 ufc/g de suelo.

Las evaluaciones se realizaron a partir de la aparición de los primeros síntomas en los controles y luego a intervalos de 7 días, hasta la tuberización de las plantas que duró entre 3-4 meses.

En el muestreo se tomaron dos tipos de muestra:

- **Tallos:** Se hizo un muestreo de los tallos de las plantas que no mostraron síntomas de marchitez bacteriana, empezando por las plantas más viejas. Si la planta tenía más de un tallo, se tomaron muestras de todos los tallos de la maceta y se procesaron juntas como una sola muestra.
- **Tubérculos:** Se cosecharon los tubérculos producidos por todas las plantas, incluyendo aquellas que habían presentado síntomas de “Marchitez Bacteriana”, y se colocaron en bolsas de papel a temperatura ambiente, para su posterior procesamiento. En los tubérculos cosechados se evaluó los síntomas visibles causados por *R. solanacearum* así como la presencia de infección latente mediante la prueba ELISA-NCM Post-enriquecimiento (Priou, 2004a). Se evaluaron todos los tubérculos generados en cada maceta, los cuales fueron analizados en muestras compuestas de 5. El muestreo del haz vascular se hizo en lo posible sin cáscara y, cuando los tubérculos fueron demasiado pequeños se trituraron enteros.

4.5.1. Análisis de infección latente en tubérculos mediante ELISA-NCM

Las tubérculos asintomáticos fueron sometidas a la prueba de inmunodiagnóstico ELISA-NCM desarrollado en el CIP (Priou *et al.*, 1999b) para detectar de esta manera la infección latente los tubérculos de papa.

4.5.1.1. Preparación de las muestras:

Limpieza y desinfección

Los tubérculos de cada maceta fueron contados y colocados en vasos de precipitación de 250 ml, luego fueron lavados con agua corriente para desechar los restos del sustrato Promix. Posteriormente fueron remojados en lejía al 0,05% durante 5 minutos, luego de lo cual se descartó la lejía y se procedió a enjuagarlos con agua corriente, después se les desinfectó con alcohol al 70% durante 30 segundos y finalmente se enjuagó los tuberculos con agua destilada esteril. Después del proceso de desinfección los tubérculos fueron colocados en papel toalla y dejados secar por espacio de media hora.

Extracción de las muestras

Dependiendo del tamaño del tubérculo, se cortó con un bisturí (flameado con alcohol) una rodaja del tubérculo de 0,5 a 1cm aproximadamente por el lado del estolón. Posteriormente se tomó una muestra del anillo vascular y se colocó en una bolsa de plástico de primer uso, se pesó y se maceró con la ayuda de un mazo de madera, luego se adicionó una solución tampón citrato estéril (Anexo 10.5) (3 ml por g de material vegetal).

Proceso de enriquecimiento

Para el proceso de enriquecimiento se colocó 500µl del extracto de la muestra en 500µl de SMSA 1X (Anexo 10.3) colocados en tubos Eppendorf estériles de 1,5 ml y se incubó durante 48 horas a 30° C con agitación constante (170 rpm).

Colocación de muestras sobre la membrana

Para realizar la prueba de inmunoabsorción con conjunto enzimático se utilizó membranas de nitrocelulosa (NCM) de tamaño de poro de 0.45 μ m (Biorad) de 8 x 12 cm, las cuales fueron sumergidas en 30 ml del tampón TBS (Anexo 10.5) durante 5 minutos. Luego, una hoja de papel filtro (Whatman 3 MM) previamente humedecida con buffer TBS fue colocada sobre la superficie del aplicador de muestras conectado a una bomba de vacío. Posteriormente, se colocó la membrana de nitrocelulosa sobre la hoja de papel filtro y sometido al sistema de vacío (125 mm de mercurio) para eliminar las burbujas de aire. Finalmente, se colocó 20 μ l del extracto enriquecido del tubérculo sobre la membrana y una vez colocadas todas las muestras, la membrana fue trasferida a un papel filtro seco y se dejó secar por 1 hora. La membrana fue identificada con un número en la esquina inferior izquierda con un lápiz.

4.5.1.2. Prueba serológica

Las membranas de nitrocelulosa con las muestras se incubaron durante 1 hora en agitación constante de 50 rpm en 30 ml de la solución de bloqueo (Anexo 10.5) dispensada en una placa de Petri de 15 cm de diámetro.

Se descartó la solución de bloqueo y la membrana se incubó durante 2 horas en agitación de 50 rpm en 30 ml de la solución de anticuerpos 1:1000 (30 μ l de antisuero específico de *R. solanacearum* diluidos en otros 30 ml de la misma solución de bloqueo). Posteriormente se descartó la solución de anticuerpos y se lavó la membrana con 30 ml de T-TBS en agitación de 100 rpm durante 3 minutos tres veces, esto con el fin de remover el excedente de anticuerpos de *R. solanacearum*. Después se colocó la membrana en 30 ml de la solución del conjugado, el cual contiene

anticuerpos cabra-anticonejo conjugado con fosfatasa alcalina (Biorad) a una concentración final de 1:4000, y se incubó durante 1 hora en agitación constante de 50 rpm.

Cuando finalizó la incubación se lavó la membrana 3 veces nuevamente con 30 ml de T-TBS, con agitación a 100 rpm durante 3 minutos cada una, para remover el excedente del conjugado. Durante el último paso de lavado, se preparo la solución sustrato NBT/BCIP (ver anexo) añadiendo primero 100 μ l de la solución NBT por cada 25 ml de la solución tampón sustrato y luego gota a gota 100 μ l de la solución BCIP (por cada 25 ml de la solución tampón sustrato). Esta solución NBT/BCIP al ser muy sensible a la luz, debe prepararse en un Erlenmeyer cubierto con papel aluminio, así como también se debe tener en cuenta que esta solución contiene componentes altamente tóxicos capaces de ser absorbidos por la piel, por lo que se recomienda el uso de guantes en el momento de la preparación.

Finalmente la membrana se incubó en 25 ml de la solución sustrato NBT/BCIP en agitación constante de 50 rpm durante 10 minutos, tiempo en el cual se dejó que se produzca la reacción verificando el desarrollo de la coloración púrpura en los controles positivos. La reacción fue detenida por el descarte de la solución sustrato y por el lavado de la membrana con agua corriente. Luego la membrana fue colocada sobre hojas de papel filtro para su secado. Las muestra positivas aparecen de color púrpura y la variación del color entre púrpura claro y púrpura oscuro depende de la concentración de *R. solanacearum* en las muestras.

4.6. Análisis de datos

Luego de las inoculaciones se evaluó semanalmente la presencia o ausencia de síntomas de MB, los cuales fueron reportados en términos de frecuencia de aparición de los síntomas de la MB. A estos datos se adicionaron los datos de la presencia o ausencia de infección latente en los tallos de dichos clones, los cuales también fueron reportados en términos de frecuencia de plantas con infección latente.

Para el tercer tamizado, los resultados fueron reportados en términos de frecuencia de la aparición de los síntomas de la MB y de infección latente tanto en tallos, tubérculos como estolones y de porcentaje de plantas infectadas sumando el número de plantas con síntomas visibles y las plantas con infección latente en tallos y tubérculos.

V. RESULTADOS

5.1. Primer tamizado: Evaluación de la resistencia a la cepa CIP204 Filotipo II/ Biovar 2A/ Raza 3 de *R. solanacearum*.

De un total de 4472 genotipos analizados, pertenecientes a 113 especies, sub especies y variedades diferentes de papa silvestre, se seleccionaron 178 genotipos (3.98 %) resistentes a la cepa CIP204 (Filotipo II/Raza 3/Biovar 2A) de *Ralstonia solanacearum* bajo condiciones de invernadero (28-32°C). El resto de genotipos fueron susceptibles a la cepa CIP204 (96.02 %). Los genotipos seleccionados por su resistencia a la cepa CIP204, pertenecen a 83 entradas y 30 especies diferentes. De los 178 genotipos seleccionados, 68 genotipos (38.2 %) pertenecen a la especie *Solanum acaule* Bitter (Tabla 7 y Figura 9).

Por otro lado, de un total de 177 genotipos resistentes al “Tizon Tardío” evaluados por su resistencia a la cepa CIP204 (Filotipo II/Raza 3/Biovar 2A) de *R. solanacearum* bajo condiciones de invernadero (28-32°C), se seleccionaron 33 genotipos resistentes a *Ralstonia solanacearum* pertenecientes a 9 especies diferentes, de los cuales 24 genotipos no presentaron infección latente en tallos. Además, 7 de los genotipos seleccionados (21.2 %) pertenecen a la especie *S. demissum* y otros 7 genotipos (21.2 %) , pertenecen a la especie *S. megistacrolobum*. Lamentablemente uno de los genotipos seleccionados se perdió durante la multiplicación por problemas con hongos.

Tabla 7. Lista de entradas evaluadas que presentaron al menos un genotipo resistente a la cepa CIP204 (Biovar 2A). El suelo fue inoculado con *R. solanacearum* a 10^8 ufc/g suelo y el experimento fue mantenido bajo condiciones de invernadero a temperatura controlada (28-32°C).

Número CIP	Número de Colector	Especie	Número de Genotipos Analizados	Número de Genotipos Resistentes (Cepa CIP204)
760484	HAM 2	acl	7	1
760506	HAM 70	acl	14	2
760213	HHCH 4243	acl	12	6
	HHCH 4854	acl	4	1
760339	HHCH 5071	acl	7	4
760346	HHCH 5081	acl	7	3
761129	OCH 8611	acl	9	2
761214	OCH 11322	acl	5	1
761624	OCH 13545	acl	13	10
761627	OCH 13555	acl	5	1
761803	OCH 13794	acl	10	1
761824	OCH 13819	acl	14	1
761832	OCH 13831	acl	13	2
761987	OCH 14315	acl	11	1
762432	OCH 15820	acl	9	2
762567	OCH 15825a	acl	9	3
762446	OCH 15835	acl	9	1
761288	OCHS 11825	acl	22	4
761292	OCHS 11831	acl	7	6
762140	OCHS 14926	acl	11	2
762145	OCHS 14931	acl	17	2
762297	OCHS 15465	acl	13	2
762341	OCHS 15609	acl	12	1
762821	SS 7202	acl	43	9
763615	OCHS 16174	adg	19	3
761452	OCH 12089	alb	3	3
762917	SSTH 7399	alb	8	2
760259	HHCH 4562	ber	3	1
761891	OCH 14163	blb	26	2
761030	OCHS 11915	cap	8	1
760645	HOFF 1533	chc	13	5
763609	OCHS 16060	chm	1	1
761870	OCH 13963	chq	13	1
762573	OCHS 12566	chq	11	1
762616	OCHS 16118	cjm	12	1
762617	OCHS 16119	cjm	8	1

Tabla 7 (continuación)

Número CIP	Número de Colector	Especie	Número de Genotipos Analizados	Número de Genotipos Resistentes (Cepa CIP204)
761080	FB 4001	cmm	18	2
761084	FB 4005a	cmm	5	1
761092	FB 4025C1.12	cmm	13	1
761097	FB 4025C50.1	cmm	10	2
761101	FB 5078	cmm	9	1
761104	FB 5080	cmm	7	1
762454	URY 4	cmm	4	1
762468	URY 22	cmm	15	3
762475	URY 31	cmm	9	2
762129	OCHL 14826	cnt	4	1
	COR 14237	dms	102	3
761048	OCH 14161	dms	1	1
761893	OCH 14154	dms	18	7
761899	OCH 14168	hou	14	4
761902	OCH 14172	hou	11	1
762930	SSTS 7311	hro	9	2
761947	OCH 14268	inc	11	2
761895	OCH 14159	iop	10	1
760534	HAM 187	mcd	16	5
760430	HHA 6502	mcd	4	1
760466	HHA 6650	mcd	29	1
762320	OCHS 15552	mcd	5	1
760535	HAM 200	mga	16	3
761109	OCH 7609	mga	117	2
761403	OCH 12032	mga	27	5
760292	HCH 4615	opl	14	1
761868	OCH 13959	pur	19	1
761072	OCHS 11615	pur	9	1
761113	OCH 7613	rap	102	3
763042	AST 76	scr	10	1
760511	HAM 88	scr	14	1
763091	HAO 114	scr	19	2
761586	OCH 13336	sgr	10	4
763860	TRHRG 215	sph	22	1
760239	HCH 4428	spl	8	2
760455	HHA 6597	spl	9	1
760232	HHCH 4414	spl	8	1
763191	OCH 2064a	spl	6	1
761001	OCHS 11911	spl	10	5
762832	SS 7213	spl	17	1

Tabla 7 (continuación)

Número CIP	Número de Colector	Especie	Número de Genotipos Analizados	Número de Genotipos Resistentes
761884	OCH 14135	sto	10	1
762858	SS 7238	swy	22	2
760312	HHCH 4758	tor	14	1
763728	OKA 7614	vrn	20	1
763080	HAO 22	vrn	6	1
763710	OKA 5855	vrn	10	1
763101	HAW 1108	und	61	1
Total	83	30	1312	178

Especie: Ver lista de acrónimos de las especies (Anexo 10.1).

Tabla 8. Lista general de entradas resistentes al “tizón tardío” analizadas para su resistencia a la Marchitez Bacteriana usando la cepa CIP204-Bv 2A de *Ralstonia solanacearum* a 1×10^8 ufc/g de suelo bajo condiciones de invernadero (20-32°C).

Nro. CIP	Nro. Colector	Especie	Nro. Genotipos	Nro. Genotipos Resistentes	Código Tizón Tardío	Genotipos sin I.L. en tallos
761030	OCHS 11915	cap	3	1	06b19	
761399	OCH 12026	chc	2	0		
761870	OCH 13963	chq	4	1	08a47	
762573	OCHS 12566	chq	4	1	08b38	08b38
762616	OCHS 16118	cjm	7	1	09b35	
762619	OCHS 16121	cjm	1	0		
762454	URY 4	cmm	1	0		
762475	URY 31	cmm	5	1	10c43	10c43
762185	OCHS 15011	cnd	1	0		
761893	OCH 14154	dms	18	6	46a7	46a7
					46a10	46a10
					46a11	46a11
					46a14	46a14
					46a21	46a21
					46a31	
761050	OCH 14218	dms	43	1	46c20	
761899	OCH 14168	hou	14	4	47a3	47a3
					47a10	
					47a19	47a19
					47a22	47a22
761902	OCH 14172	hou	2	1	47c29	47c29
760531	HAM 176	mcd	2	0		
760534	HAM 187	mcd	16	5	15c2	
					15c4	15c4
					15c10	15c10
					15c15	
					15c48	

Tabla 8 (continuación)

Nro. CIP	Nro. Colector	Especie	Nro. Genotipos	Nro. Genotipos Resistentes	Código Tizón Tardío	Genotipos sin I.L. en tallos
762314	OCHS 15534	mcd	6	0		
760535	HAM 200	mga	16	3	26a25	26a25
					26a40	26a40
					26a42	26a42
761403	OCH 12032	mga	19	5	26b2	26b2
					26b7	26b7
					26b8	26b8
					26b24	26b24
					26b42 (genotipo perdido)	26b42
761586	OCH 13336	sgr	4	4	33b14	
					33b19	33b19
					33b33	33b33
					33b47	33b47
761928	OCH 14208	snk	4	0		
761062	OCH 14145	sto	5	0		
Total	21	13	177	34	34	24

Especie: Ver lista de acrónimos de las especies (Anexo 10.1).

I.L.: Infección latente

Tabla 9. Resumen de especies resistentes al “tizón tardío” analizadas para su resistencia a la Marchitez Bacteriana usando la cepa CIP204-Bv 2A de *Ralstonia solanacearum* a 1×10^8 ufc/g de suelo bajo condiciones de invernadero (20-32°C).

Especies	Acr	Nro. De Entradas	Nro. de genotipos analizados por entrada	Nro. de genotipos resistentes
<i>S. circaeifolium</i> var. <i>capsicibaccatum</i>	cap	1	3	1
<i>S. chacoense</i>	chc	1	2	0
<i>S. chiquidenum</i>	chq	2	8	2
<i>S. cajamarquense</i>	cjm	2	8	1
<i>S. commersonii</i>	cmm	2	6	1
<i>S. candolleanum</i>	cnd	1	1	0
<i>S. demissum</i>	dms	2	61	7
<i>S. hougassii</i>	hou	2	16	5
<i>S. microdontum</i>	mcd	3	24	5
<i>S. megistacrolobum</i>	mga	2	35	7
<i>S. sogorandinum</i>	sgr	1	4	4
<i>S. iopetalum</i>	snk	1	4	0
<i>S. stoloniferum</i>	sto	1	5	0
Total	13	21	177	33

Acr: Acrónimo del nombre científico de la especie silvestre.

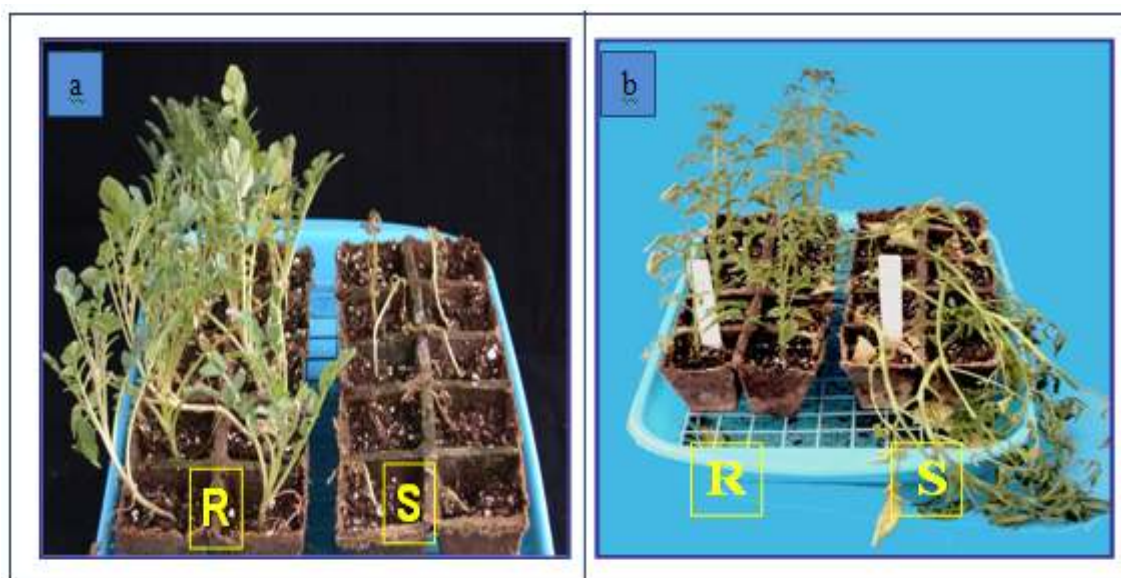


Figura 9. a) Genotipo de *S. acaule* resistente a *R. solanacearum* y b) Genotipo de *S. chacoense* resistente a *R. solanacearum*.

5.2. Segundo tamizado: Evaluación de la estabilidad de la resistencia con 7 cepas de *R. solanacearum* Filotipo II / Biovar 2A / Raza 3.

Para asegurar la estabilidad de la resistencia a la marchitez bacteriana de la papa, los genotipos seleccionados con la cepa CIP204 fueron re-evaluados con 7 cepas de *R. solanacearum* que representan la diversidad genética que existe dentro de la Raza 3/ Biovar 2A en América Latina. Algunos genotipos fueron evaluados 2 veces para confirmar la estabilidad de la resistencia. De 162 genotipos resistentes a la cepa CIP204 analizados, se seleccionaron 52 genotipos (32,1%) por su resistencia a por lo menos 4 cepas, en ambas dosis en el tamizado con las siete cepas del patógeno (Tabla 10 y 11).

Los genotipos seleccionados pertenecen a 10 especies diferentes y se distribuyen de la siguiente manera: 27 de los genotipos seleccionados (52%) pertenecen a la especie *S. acaule*, 6 genotipos pertenecen a la especie *S. commersonii* (11%), 5 genotipos pertenecen a la especie *S. demissum* (9%), 4 genotipos pertenecen a la especie *S. albicans* (8%) y los 10 genotipos restantes pertenecen a las especies *S. acaule subsp. acaule f. incuyo*, *S. chacoense*, *S. huarochiriense*, *S. megistacrolobum*, *S. raphanifolium* y *S. sogarandinum* (20%) (Figura 10).

89 genotipos (54,9%) se eliminaron debido a su susceptibilidad frente a las 7 cepas de *R. solanacearum*. No se pudo presisar la estabilidad de la resistencia en 21 genotipos (13%), por lo que estos genotipos necesitan re-evaluación para determinar su reacción frente a las 7 cepas de *R. solanacearum* (Tabla 13).

Por otro lado, de los 52 genotipos seleccionados, 7 genotipos también son resistentes al tizón tardío de la papa: 4 genotipos pertenecientes a la especie *S.*

demissum (bw014027, bw014028, bw014030, bw014032); 1 genotipo perteneciente a la especie *S. megistacrolobum* (bw014015); y dos genotipos pertenecientes a la especie *S. sogarandinum* (bw014024, bw014025) (Tabla 12).

La entrada OCH 14154 (CIP 761893) presentó 4 genotipos resistentes, siendo la entrada con más genotipos seleccionados, todos ellos también resistentes al tizón tardío de la papa.

Por otro lado, las entradas HHCH 4243 (CIP 760213), OCH 13545 (CIP 761624), OCH 15825a (CIP 762567) y SS 7202 (CIP 762821) también presentaron un buen nivel de resistencia, siendo seleccionados 3 genotipos de cada una de estas entradas.

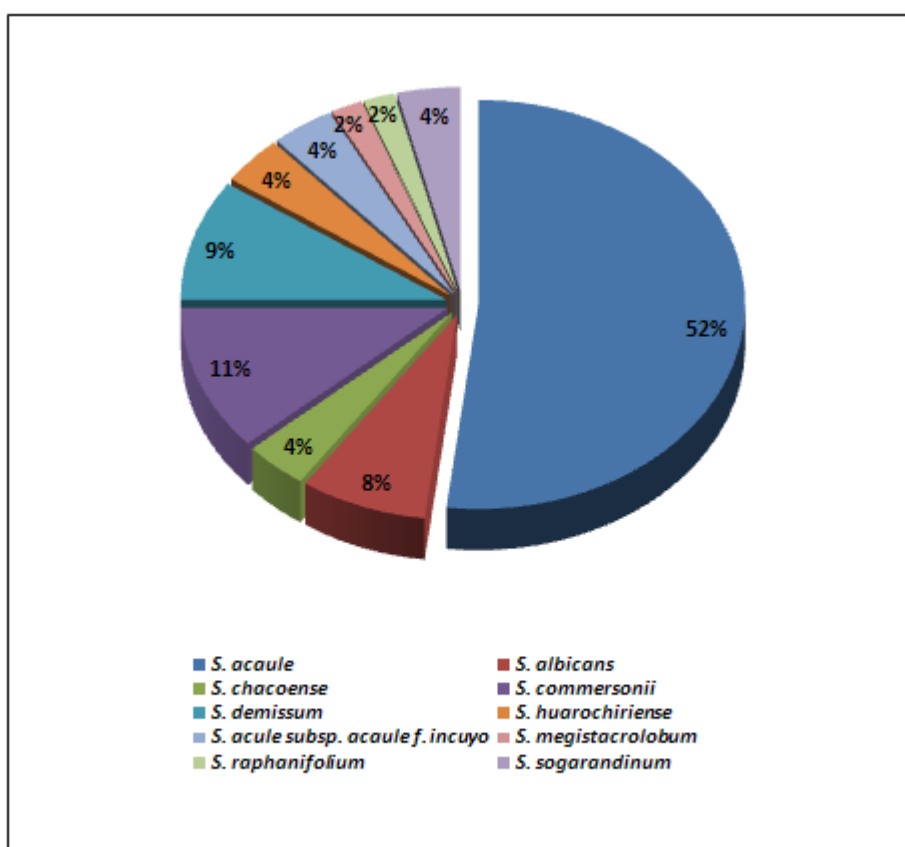


Figura 10. Porcentaje de genotipos por especie seleccionadas para la prueba de Infección en Tubérculos.

Tabla 10. Lista de genotipos analizados con 7 cepas (Biovar 2A/Filotipo II) a dos concentraciones: 1×10^8 y 5×10^7 ufc/g de suelo. Las inoculaciones fueron realizadas en invernadero bajo condiciones controladas (28-30°): Segundo Tamizado I.

			Segundo Tamizado I																										
Conc.	Número CIP	Número de Colector	Genotipo	Dosis del Inoculo 5 x 10 ⁷ ufc/g suelo												Dosis del Inoculo 1 x 10 ⁸ ufc/g suelo													
				CIP204	CIP434	CIP163	CIP311	CIP261	CIP076	CIP372				CIP204	CIP434	CIP163	CIP311	CIP261	CIP076	CIP372									
				% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.				
T	760213	HHCH 4243	bw071004*	20	0	0	0	0	0	0	0	20			20	0	0	10	0	0	0	0	0	0					50
E	760213	HHCH 4243	bw071005	20	0	0	0	0	0	11	20	40			10	0	0	0	0	10	0	0	50	40					40
E	760213	HHCH 4243	bw071008	20	0	0	10	0	0	0	30	0	0	20	30	20	0	0	0	0	0	0	50	40					40
T	760213	HHCH 4243	bw071011	0	0	10	0	0	0	30	20	20			0	0	0	0	0	0	0	0	20	30					30
T	760213	HHCH 4243	bw071012*	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	20	20	20	30						30
T	760316	HHCH 4854	bw071021	10	0	0	0	0	0	0	0	40			30	0	0	0	11	0	0	40	0	0					40
E	760339	HHCH 5071	bw071025	10	0	10	0	0	0	0	20	30			10	0	0	10	0	0	0	40	20	0					20
R	760339	HHCH 5071	bw071026	0	0	0	0	0	0	30	10			40	0	11	0	0	0	0	0	30	10						10
E	760339	HHCH 5071	bw071028	0	40	0	0	0	20	10	50			30	30	0	0	0	0	0	0	40	20						40
E	760339	HHCH 5071	bw071030	30	0	0	0	0	0	0	30	20			40	10	0	0	10	10	20	40	30						30
E	760346	HHCH 5081	bw071032	0	0	0	0	0	25	10	30			0	40	0	0	0	0	0	0	40	20						20
T	760346	HHCH 5081	bw071036*	10	10	0	0	0	0	20	0	0	0	30	10	30	0	0	0	0	0	10	0*	20					20
T	760346	HHCH 5081	bw071037*	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					0
E	760484	HAM 2	bw020008	10		0	0	0	0	0	10	10			40	0	0	0	0	0	0	20	50						30
E	760506	HAM 70	bw100012	10	20	10	0	10	0	20	20			30	30	20	0	10	20	10	20	10	40						40
E	761129	OCH 8611	bw020011	10	0	0	0	0	10	0	10			20	20	0	0	0	0	20	40	30	40						0
R	761214	OCH 11322	bw020022	20	10*	10*	0*	0	0*	0	0*			10*	30	0*	0*	20*	10	10	20	40	0						0
E	761288	OCHS 11825	bw020100*	0	10	0	0	10	0	10	10			0	10	0	0	10	10	10	20	20	10						10
T	761288	OCHS 11825	bw020105*	0	30	0	0	0	0	0	0			0	20	0	0	0	0	0	10	30	20						20
R	761288	OCHS 11825	bw020108	0	0	10	0	0			0			20	0	0	0	0				30							
T	761288	OCHS 11825	bw020111*	0	0	0	0	0	10	30				0	0	10	10	30	10	0	0	0							
R	761292	OCHS 11831	bw019004	0	0	10	0	0						0	0	0	10	10	30	10	0	0							
T	761292	OCHS 11831	bw019005*	10	0	0	0	0	11	0	0			20	20	0	0	0	0	0	30	0							20
E	761292	OCHS 11831	bw019006*	0	0	0	0	0	10					0	10	10	10	20	20	20	20								
E	761292	OCHS 11831	bw019008*	0	22	0	0	0	0	0				0	0	0	22	0	0	0	0	0							
R	761292	OCHS 11831	bw019009	30	10	0	0	0						40	20	0	0	0	0	0	0								
T	761292	OCHS 11831	bw019010	0	0	20	0*	0	0	0	10			0*	0*	0*	10*	0*	0*	0*	0*	30	20						20
E	761624	OCH 13545	bw020028	10	10	0	0	0	20	0	10			20	20	0	20	0	20	0	20	20	20						20

Tabla 10 (continuación)

		Segundo Tamizado I				Dosis del Inoculo 5 x 10 ⁷ ufc/g suelo										Dosis del Inoculo 1 x 10 ⁸ ufc/g suelo											
	Número CIP	Número de Colector	Genotipo	CIP204						CIP163						CIP261						CIP311					
				% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW
Conc.																											
E	761624	OCH 13545	bw020029*	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T	761624	OCH 13545	bw020030*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T	761624	OCH 13545	bw020037*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	761624	OCH 13545	bw020038	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	761624	OCH 13545	bw020039	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	761624	OCH 13545	bw020040	30	0	10	0	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	0	0	0	0	0
T	761624	OCH 13545	bw020041	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	761624	OCH 13545	bw020044	0	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	0	0	0	0	0	0
E	761624	OCH 13545	bw020047	0	20	0	0	0	0	10	0	20	0	20	0	20	0	20	0	20	0	0	0	0	0	0	0
R	761627	OCH 13555	bw020049	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T	761803	OCH 13794	bw020053*	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T	761824	OCH 13819	bw020076*	0	10	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	761832	OCH 13831	bw020080*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	761832	OCH 13831	bw020081*	0	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	761987	OCH 14315	bw100050	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T	762140	OCHS 14926	bw011044*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T	762140	OCHS 14926	bw011049*	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T	762145	OCHS 14931	bw011080*	10	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T	762145	OCHS 14931	bw011087*	0	0*	0	0	0	0	0*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	762297	OCHS 15465	bw049004*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T	762297	OCHS 15465	bw049007*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	762341	OCHS 15609	bw020135	40	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	762432	OCH 15820	bw100056	30	10	10	0	10	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	0	0	0	0	0
E	762432	OCH 15820	bw100059	30	10	10	0	20	10	0	20	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	0	0	0	0	0
T	762446	OCH 15835	bw020096*	10	0	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T	762567	OCH 15825a	bw011015	0*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T	762567	OCH 15825a	bw100063	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T	762567	OCH 15825a	bw100064*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T	762821	SS 7202	bw040004*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 10 (continuación)

			Segundo Tamizado I																																
Conc.	Número CIP	Número de Colector	Genotipo	Dosis del Inoculo 5 x 10 ⁷ ufc/g suelo												Dosis del Inoculo 1 x 10 ⁸ ufc/g suelo																			
				CIP204		CIP434		CIP163		CIP311		CIP261		CIP076		CIP372		CIP204		CIP434		CIP163		CIP311		CIP261		CIP076		CIP372					
				% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.				
E	762821	SS 7202	bw040010	20	0	10							10	10											30	20					30	40			
R	762821	SS 7202	bw040017				0		0	10																		0		0	30	40			
R	762821	SS 7202	bw040024	10		0	10		20																10		0	0	20	30					
E	762821	SS 7202	bw040025	10							10		0	20											30					20	30	40			
E	762821	SS 7202	bw040028	10				0		10	40													10					10	20	50				
T	762821	SS 7202	bw040035	0				0		0			0											0	12	0		0	0	10	20				
T	762821	SS 7202	bw040036*	0	0			0	10															10					10			10			
E	762821	SS 7202	bw040040	30	20				10				20	0										30		0	0				40	30			
		<i>S. acaule</i> subsp. <i>acaule</i> f. <i>incuyo</i> Ochoa.																																	
T	761947	OCH 14268	bw011114*	20	0		0		0	10			20											20		0	0	0	0	20	10	20			
T	761947	OCH 14268	bw020148*	10	0	0	0	10		10			0											30		20		0	10	0	10	0			
		<i>S. albicans</i> Ochoa.																																	
T	761452	OCH 12089	bw039001	0	0	0	0	0	0	0			0	0										0	0	0	0	0	0	0*	0	0	0		
T	761452	OCH 12089	bw039003*	0	11	20	0	0	0				0	10										10		10		0	0	11		20	0	0	
T	761452	OCH 12089	bw039004	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	11	0	0	0	0	0	0		
T	762917	SSTH 7399	bw071054	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20		0	0	10	0	0	0	10	0	0	
R	762917	SSTH 7399	bw071055	0	0	0			0				0	0									0	20		0	0	13	10				0		
		<i>S. bulbocastanum</i> Dunal																																	
E	761897	OCH 14163	bw071161	0	10	10	0		10				40											30		20		20	0	0		0	11	60	
E	761897	OCH 14163	bw071168	10	20	20	0		20				20										0	50		30		0	0		20	40			
		<i>S. cajamarquense</i> Ochoa																																	
E	762616	OCHS 16118	bw014001	10	0	10	10	0	13	0	10		20										10		30		20	0	0	30	20	20			
R	762617	OCHS 16119	bw040236	10	40	10			10														10		60		20								
		<i>S. cantense</i> Ochoa																																	
E	762129	OCHL 14826	bw040469	50	60		0	20		0			30	0									20		40		0	0	10		80	0	10	60	
		<i>S. chacoense</i> Bitter.																																	
T	760645	HOFF 1533	bw071192*	10	10	0	0	0	0	20	0	0	10										20		10		0	0	20		10	0	10		
T	760645	HOFF 1534	bw071193*	0	0	20	0	0	0	10	0	13	0	10	10								0	0	0	0	0	20	0	0	20	0	22	10	
R	760645	HOFF 1535	bw071196	10	0	10	0	0	0	30													0	0	10		0	0	0	40	0	0	10		

Tabla 10 (continuación)

			Segundo Tamizado I																												
Conc.	Número CIP	Número de Colector	Genotipo	Dosis del Inoculo 5 x 10 ⁷ ufc/g suelo												Dosis del Inoculo 1 x 10 ⁸ ufc/g suelo															
				CIP204		CIP434		CIP163		CIP311		CIP261		CIP076		CIP372		CIP204		CIP434		CIP163		CIP311		CIP261		CIP076		CIP372	
				% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.
E	760645	HOFF 1536	bw071197	10	10	10	10	40	0	0	30	10	10	10	30	0	40	10	20	10	10	30	20	10	30	20	50	50			
	<i>S. chiquidenum</i> Ochoa.																														
R	761870	OCH 13963	bw014002	20	10		0	0						10			10	20			30							40			
E	762573	OCHS 12566	bw014003	10	30	10	10	10					10	30			20	40	10	20							20	30			
	<i>S. chomatophyllum</i> Ochoa																														
E	763609	OCHS 16060	bw0330768	20	30	10	10	10					10	40			20	40	10	20							20	30			
	<i>S. circaeifolium</i> Bitter var. <i>capsicibaccatum</i> (Cardenas) Ochoa																														
E	761030	OCHS 11915	bw014004	0	50	0	0	50					40	10			20	50	10			0	0	40				40			
	<i>S. commersonii</i> Dunal.																														
T	761080	FB 4001	bw0630301	0	0	0	0	0	10			0	0	0	0	0	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
T	761080	FB 4001	bw0630316*	20	20	0	0	0	0	0	20			0	0	0	20	20	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0			
T	761090	FB 4025a	bw0330070	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	10	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0			
E	761092	FB 4025C1.12	bw0330073	10	30	10					30			0	20			40	10								10	30			
E	761097	FB 4025C50.1	bw0330082	20	10	0	0	0	0	10			0	10	10			20	20	0	0	0	0	0	0	0	20	0			
E	761097	FB 4025C50.1	bw0330087	30	10	0	0	0	0	0	10			0	0	0	20	30	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0			
E	761104	FB 5080	bw0330092	10	10	0	0	0	0	20			10		10			10	10	0	0	0	0	0	0	0	10	10			
T	762454	URY 4	bw071242*	0	0	10				0	10			0	0	0	20	10	0	0	0	11	0	0	0	0	0	20			
T	762468	URY 22	bw071249	0	20	0	13	0	0	10	10			0	20	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	40				
T	762468	URY 22	bw071262*	0	22	0	0	0	0	0	30			0	0	0	30	10	0	0	0	0	0	0	0	10	20				
	<i>S. demissum</i> Lindl.																														
E	761048	OCH 14161	bw040502	10	10		0	0	0	0	10			30			0	20	10	20							60				
T	761893	OCH 14154	bw014027	0		0	0	10		10			0	50	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0	0	10	10				
T	761893	OCH 14154	bw014028	10		0	0	0	0	10			0	11	20			0	10	0	10					0					
E	761893	OCH 14154	bw014029	0	0	20	0	10		20			0	0	0	11	10	20	0	10						0	30				
T	761893	OCH 14154	bw014030	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
E	761893	OCH 14154	bw014031	20		0		10		40			0	11	0		20	30								0	20				
T	761893	OCH 14154	bw014032	0	0	0	0	10	0	10			0	10	0	22	0	10	0	0	0	0	0	0	0	20	0				
E	761893	OCH 14154	bw014033	20		0	0	0	0	30			0	33	20			20	0	10	0	30				0	30				
T		COR 14237	E 11*	0	20	0	0	0	0	10			10				10	10	0	0	0	10				10	20				

Tabla 10 (continuación)

			Segundo Tamizado I																												
Conc.	Número CIP	Número de Colector	Genotipo	Dosis del Inoculo 5 x 10 ⁷ ufc/g suelo												Dosis del Inoculo 1 x 10 ⁸ ufc/g suelo															
				CIP204	CIP434	CIP163	CIP311	CIP261	CIP076	CIP372	CIP204	CIP434	CIP163	CIP311	CIP261	CIP076	CIP372	CIP204	CIP434	CIP163	CIP311	CIP261	CIP076	CIP372							
				% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.						
E		COR 14237	E 29	40	10	10	0	10	20	10	60	30	20	0	20	40	10	60	30	20	0	33	20	40	20	40	20	0	30	30	
E		COR 14237	E 78	0	0	0	10	0	20	10	20	30	20	0	20	40	10	20	30	20	0	33	20	40	20	40	20	0	20	20	
E	763101	HAW 1108	F 22	10	10	20	0	22	20	20	30	30	20	0	10	50	30	30	20	20	0	10	50	30	30	30	30	0	30	30	
	S. huarochiricense Ochoa																														
T	762930	SSTS 7311	bw040557	20	0	0	0	0	10	0	0*	0	0	0*	0	0*	0	0	0*	0	0*	0	0*	0	0	0	0	0*	0	0*	0*
T	762930	SSTS 7311	bw040558	10	0	0	0	0	0	0	0*	10	0	0*	0	0*	10	0	0	0*	0	0	0	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
	S. iopetalum (Bitter) Hawkes																														
E	761895	OCH 14159	bw040574	20	60	10	20	20	0	10	40	60	20	80	60	20	80	60	20	80	60	20	80	60	20	80	60	20	50	50	50
	S. megistacrolobum Bitter																														
E	760535	HAM 200	bw014010	30	50	20	0		0	0	0	50	30	0	20	10	0	50	30	0	20	10	0	20	40	40	40	40	40	40	40
E	760535	HAM 200	bw014011	10	0	0	0	20	0	10	20	10	20	0	20	0	10	20	10	20	0	20	0	20	0	0	0	0	0	0	0
E	760535	HAM 200	bw014012	10	30	0	0	10	10	40	40	30	0	0	40	30	80	40	30	0	0	20	30	0	20	0	0	0	0	0	0
E	761403	OCH 12032	bw014013	60	50	40	0	40	20	80	30	50	0	0	30	50	30	30	50	0	0	30	90	20	20	70	70	70	70	70	70
E	761403	OCH 12032	bw014014	20	20	10	0	30	0	30	20	30	0	0	0	30	20	30	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T	761403	OCH 12032	bw014015	0	0	0	0	10	20	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	10	10	10	10	10
R	761403	OCH 12032	bw014016	0	0	0	10	10	0	20	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	10	0	0	0	0	10	20	20	20	20	20
	S. megistacrolobum Bittersubsp. toralapanum																														
E	760312	HHCH 4758	bw0330482	10	20	10	0	10	10	30	20	30	0	10	10	30	20	30	0	10	10	20	20	40	20	40	40	40	40	40	40
	S. microdontum Bitter																														
E	760466	HHA 6650	bw0330330	20	20	0	10	10	20	10	20	20	0	0	20	20	10	20	0	0	20	20	20	20	0	10	10	10	10	10	10
R	760534	HAM 187	bw014018	20	20		10			30	0	30		0			30	0	30		0					40	40	40	40	40	40
R	760534	HAM 187	bw014019	20	20		0	0		30	20	10		0			30	20	10		0					20	20	20	20	20	20
E	760534	HAM 187	bw014020	0	22	20	10	0	10	20	40	30	20	0	0	10	20	40	30	20	20	40	20	40	20	30	30	30	30	30	30
E	760534	HAM 187	bw014021	30	0	22	10			40	40	40	30	0			40	40	40	30	0	11				30	30	30	30	30	30
E	760534	HAM 187	bw014022	0	0	20	20		0	40	40	20	10	20	0	11	40	40	20	10	20	20	20	20	40	40	40	40	40	40	40
E	762320	OCHS 15552	bw0630594	30	30	20	10	20	0	10	10	40	30	20	20	0	10	40	40	30	20	20	40	30	30	50	50	50	50	50	50
	S. oplocense Hawkes																														
E	760292	HCH 4615	bw0330280	20	30	0	0	30	0	10	40	30	10	10	30	0	10	40	30	10	10	60	10	10	10	30	30	30	30	30	30

Tabla 10 (continuación)

			Segundo Tamizado I																														
Conc.	Número CIP	Número de Colector	Genotipo	Dosis del Inoculo 5 x 10 ⁷ ufc/g suelo												Dosis del Inoculo 1 x 10 ⁸ ufc/g suelo																	
				CIP204		CIP434		CIP163		CIP311		CIP261		CIP076		CIP372		CIP204		CIP434		CIP163		CIP311		CIP261		CIP076		CIP372			
				% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.		
	<i>S. piurae</i> Bitter																																
E	761072	OCHS 11615	bw011634	0	30		30		20		30		30	0		0		40		40		40		40		40		40		0		0	
E	761868	OCH 13959	bw020645	20	30		30		30		40		40	0		20		30		20		30		20		0		0		0		0	
	<i>S. raphanifolium</i> Cardenas & Hawkes.																																
E	761113	OCH 7613	A 69	0	30		10		0	0	0	20	10		10		10		40		20		10		10		20		20		20		20
E	761113	OCH 7613	A 76	0	20		10		0	0	20	10	10		10		10		20		20		30		30		30		30		30		30
T	761113	OCH 7613	A 100*	10	10		0	0	0	0	0	0	0	10		0		20		20		0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40
E	761109	OCH 7609	B 34	0	70	10	10	10	0	0	0	22	10	30		10		20		10		10		10		10		50		70		70	
E	761109	OCH 7609	B 74*	0	10		10		0	0	0		0	20		0		20		10		10		10		20		20		20		20	
	<i>S. sawyeri</i> Ochoa																																
E	762858	SS 7238	bw020722	30	20		0	10	30		0	0	0	10	20		50		30		10		40		30		30		20		20		20
E	762858	SS 7238	bw020724	0	10	10		0	10		0	0	10	10	10		20		30		20		30		60	10	40		40		40		40
	<i>S. sogarandinum</i> Ochoa																																
R	761586	OCH 13336	bw014023	0	0				0					10		0		30		10		0		10						0		0	
T	761586	OCH 13336	bw014024	0	0		0	20	10			0	0	0	0		20		0		11	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	22	
T	761586	OCH 13336	bw014025	10	0	56	0	0	0			10	10	10		10		10		0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R	761586	OCH 13336	bw014026	0	10		0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	10	10	10		20		10		10	0	0	0	0	0	0	
	<i>S. sparsipilum</i> (Bitter) Juz.&Buk.																																
E	760232	HHCH 4414	bw0630922	40	10		0	0	0	0	0	0	0	0	0		40		60		0	0	10		30		10		10		10		10
E	760239	HCH 4428	bw0630877	40	40		20		10		20	10	30	30		60		40		40		40		30		30		30		30		30	
E	760239	HCH 4428	bw0630879	40	30		10		10		20	30	20	20		70		50		20		20		30		40		30		30		30	
E	760455	HHA 6597	bw0630890	40	10		40		0	0	0	0	20	10		40		40		30		30		20		20		20		20		20	
R	761001	OCHS 11911	bw029004	20	10		20					0	10		50		20		20		0	0			50		50						
E	761001	OCHS 11911	bw029005	50	30		0		10		20	20	30	30		80		40		40		0		30		50		50		50		50	
E	761001	OCHS 11911	bw029008	60	20		30				20	20	40	40		90		10		10		50		60		80		80		80		80	
E	761001	OCHS 11911	bw029009	60	20		30		10		30	20	20	10		70		40		40		20		40		30		20		20		20	
E	761001	OCHS 11911	bw029010	30			20		10			10	60		70				30				80		30		70		70		70		70
E	762832	SS 7213	bw011752	0	25	0	13	0	0	0	0	40	10	40		0		20		40		0	0	0	40	40	40	40	40	40	40	50	50
E	763191	OCH 2064a	bw071498	0	60		20		0	0	20	40	40	40		0		0		60		20		60		30		30		50		50	

Tabla 10 (continuación)

Segundo Tamizado I																															
Conc.	Número CIP	Número de Colector	Genotipo	Dosis del Inoculo 5 x 10 ⁷ ufc/g suelo												Dosis del Inoculo 1 x 10 ⁸ ufc/g suelo															
				CIP204		CIP434		CIP163		CIP311		CIP261		CIP076		CIP372		CIP204		CIP434		CIP163		CIP311		CIP261		CIP076		CIP372	
				% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.
	<i>S. stenophyildium</i> Bitt.																														
E	763860	TRHRG 215	bw0630249	10	20	30	10	10	10	30	30	40	20	10	10	30	30	40	20	10	20	10	20	10	30		30				
	<i>S. stoloniferum</i> Schlechtal																														
E	761884	OCH 14135	bw100354	30	30	0	30	10	30	30	70	50	20	50	30	30	70	50	20	50	60	40	30				30				
	<i>S. sucrose</i> Hawkes																														
E	760511	HAM 88	bw0330111*	0	0	0	0				10	30	0	0		10	10	30	0	0	0	0	0	0	0	0	20				
E	763042	AST 76	bw0330005	20	30	30	20	10	10	30	50	40	20	20	10	30	50	40	20	20	20	30	30	40			0				
E	763091	HAO 114	bw0330175	40	30	30	30	0	0	50	40	30	50	0	0	40	40	30	50	0	20	0	20	0			0				
E	763091	HAO 114	bw0330181	30	40	0	0	20	30	40	0	30	0	0	30	40	0	30	0	0	60	30	40				40				
	<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i> (Primitive weed)																														
R	763615	OCHS 16174	bw0330774	0	0	0	0	10	0	10	0	20	0	0	10	0	10	20	0	0	10	10	10				10				
R	763615	OCHS 16174	bw0330780	0	0	20	0	0	0	10	10	20	0	0	10	0	10	20	0	0	10	20	10				20		0	0	
E	763615	OCHS 16174	bw100456	10	10	10	0	0	0	0	10	10	0	0	10	0	10	10	10	10	20	10	40				40				
	<i>S. vernei</i> Bitter and Wittm.																														
E	763080	HAO 22	bw0631057	30	40	10	0	30	20	30	50	50	20	0	20	30	50	50	20	40	30	40				20					
E	763710	OKA 5855	bw040850	10	20		10	20	10	10	20	20		20	10	10	20	20		30	20	20				20					
R	763728	OKA 7614	bw0631115	40	30		10				30	40		10			30	40		10											
	Controles																														
	720043		Revolución	40	17	50	0	30	0	0	40	33	80	0	0	20	0	40	50	60	25	50	20			20	0	0	0		
	720118		Cruza 148	50	0	30	0	10	0	10	0	40	0	20	13	20	40	20	30	13	20	13	20			20	0	20	0		

Donde: T: Seleccionado para Prueba de Infección en Tubérculos

R: Re-evaluar genotipo

E: Eliminar genotipo

*: Genotipo analizado dos veces con las 7 cepas (ver Tabla 12)

Tabla 11. Lista de genotipos analizados dos veces con 7 cepas (Biovar 2A/Filotipo II) a dos concentraciones: 1×10^8 y 5×10^7 ufc/g de suelo.

Las inoculaciones fueron realizadas en invernadero bajo condiciones controladas (28-30°C): Segundo Tamizado II.

Segundo Tamizado II																															
Conc.	Número CIP	Número de Colector	Genotipo	Dosis del Inoculo 5 x 10 ⁷ ufc/g suelo												Dosis del Inoculo 1 x 10 ⁸ ufc/g suelo															
				CIP204		CIP434		CIP163		CIP311		CIP261		CIP076		CIP372		CIP204		CIP434		CIP163		CIP311		CIP261		CIP076		CIP372	
				% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.
T	760213	HHCH 4243	bw071004	0*	20					0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T	760213	HHCH 4243	bw071012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T	760346	HHCH 5081	bw071036	0	10					0	0	0			10					0	40	0	0	0	0	0	20	30	0	0	
T	760346	HHCH 5081	bw071037	0	0	10				0	0	0	0	0	0	10				0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	
E	761288	OCHS 11825	bw020100	0	0	20				0	0	0	0	20	20	40				20	10	0	0	0	0	40	20	60	0	0	
T	761288	OCHS 11825	bw020105	0	0	0	0	0	11	0	22	0	0	20	0	0				30	0	0	0	0	0	13	20	0	0	0	
T	761288	OCHS 11825	bw020111	0	0	0	0	0		0	0	0	0	20	0	0				0	40	0	0	0	0	40	30	0	0	0	
T	761292	OCHS 11831	bw019005	0	10				0	0*		0	0	0	0*				0*	30	0		0	0	0	0*	0	10			
E	761292	OCHS 11831	bw019006	20					0	20		0	20		0				30	30		30	0	0	10		0	30			
E	761292	OCHS 11831	bw019008	0					0	0	0	0	0	20	0	10			30	20		0	0	0	30	30	20	0	0	0	
E	761624	OCH 13545	bw020029	10	30				0	0		0	0	0	10*	20			0*	30*	0	0	0	0	0	0*	10	30*			
T	761624	OCH 13545	bw020030	20					0	0	0	0	0	0	0*	0	0		20	0		0	0	0	0	0*	0	0	0	0	
T	761624	OCH 13545	bw020037	0	0	0			0			0		0	0	10			0	0		0	30	0*	0	0*	0	0	0	0	
T	761803	OCH 13794	bw020053	20					0	0	0	0	0	0	0	10			20	0		0	0	0*	0	0	0	0	0	0	
T	761824	OCH 13819	bw020076	0					0	0	0	0	0	10	0*	0	0		0	0		0	0	20	20	0	0	0	0	0	
E	761832	OCH 13831	bw020080	0	13	20			0	11	0	20	0	30		20			30	0	0	0	0	0	0	40	20	0	0	0	
E	761832	OCH 13831	bw020081	30	40				0		0		20	30		10			30	40		0	0	0	20	40	40	0	0	0	
T	762140	OCHS 14926	bw011044	0	0	0*			0	0	0	0	0	0	0	10*			0	0*		0*	0	0	10		0	30			
T	762140	OCHS 14926	bw011049	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20			0			0	0	0	0	0	0	20			
T	762145	OCHS 14931	bw011080	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	30			0	0	0	0	0	0	0	0	30				
E	762297	OCHS 15465	bw049004	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	20			40	30		0	10	20	0	0	20	0	0	0	
T	762297	OCHS 15465	bw049007	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10				0	10		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T	762446	OCH 15835	bw020096	0	0	0	0	0	0		0	0	0		0				0	0*		0	0	0*	0*	10	0*	0	0	0	
T	762567	OCH 15825a	bw100064	0	0	0			0	0	0	0		10		0			0	0		0	0	0	0	30	0	0	0	0	
T	762821	SS 7202	bw040004	0		0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0			0*	0*		0*	0*	0*	0	10	10	0	0	0	

Tabla 11 (continuación)

Segundo Tamizado II																																
Conc.	Número CIP	Número de Colector	Genotipo	Dosis del Inoculo 5 x 10 ⁷ ufc/g suelo												Dosis del Inoculo 1 x 10 ⁸ ufc/g suelo																
				CIP204		CIP434		CIP163		CIP311		CIP261		CIP076		CIP372		CIP204		CIP434		CIP163		CIP311		CIP261		CIP076		CIP372		
				% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	% BW	% I.L.	
T	762821	SS 7202	bw040036	0																												
	S. acaule subsp. acaule f. incuyo Ochoa.																															
T	761947	OCH 14268	bw011114	10																												
T	761947	OCH 14268	bw020148	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10																			
	S. albicans Ochoa.																															
T	761452	OCH 12089	bw039003	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																			
	S. chacoense Bitter.																															
T	760645	HOFF 1533	bw071192	10	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	20															
T	760645	HOFF 1533	bw071193	0	0	0	0	0	0	0	10	13	0	0	0	0	0	0	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	20
	S. commersonii Dunal.																															
T	761080	FB 4001	bw0630316	0					0	0	0		0																			
T	762454	URY 4	bw071242	0	10	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0	0	30	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T	762468	URY 22	bw071262	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	30	0	0	0	10	0	22	30					
	S. demissum Lindl.																															
T		COR 14237	E 11	0	0*				0*	20	0																					
	S. raphanifolium Cardenas & Hawkes.																															
E	761109	OCH 7609	B 74	0	0	10	0	0	0*	10	20																					
	S. sucrense Hawkes																															
E	760511	HAM 88	bw0330111	50	10				40	40	0																					
	Controles																															
	720043		Revolución	30	25	10	0	20	0	50	0	40	67	40	25	60																
	720118		Cruza 148	10	0	0	0	0	10	20	0	10	0	10	0	10	50	30														

Donde: T: Seleccionado para Prueba de Infección en Tubérculos

E: Eliminar genotipo

Tabla 12. Lista de genotipos por especie seleccionadas por su resistencia a al menos 4 cepas de *R. solanacearum* en ambas dosis bajo condiciones de invernadero (20-32°C).

Nro CIP	Nro de Colector	Especie	Clave BW
760213	HHCH 4243	acl	bw071004
760213	HHCH 4243	acl	bw071011
760213	HHCH 4243	acl	bw071012
760316	HHCH 4854	acl	bw071021
760346	HHCH 5081	acl	bw071036
760346	HHCH 5081	acl	bw071037
761288	OCHS 11825	acl	bw020105
761288	OCHS 11825	acl	bw020111
761292	OCHS 11831	acl	bw019005
761292	OCHS 11831	acl	bw019010
761624	OCH 13545	acl	bw020030
761624	OCH 13545	acl	bw020037
761624	OCH 13545	acl	bw020041
761803	OCH 13794	acl	bw020053
761824	OCH 13819	acl	bw020076
762140	OCHS 14926	acl	bw011044
762140	OCHS 14926	acl	bw011049
762145	OCHS 14931	acl	bw011080
762145	OCHS 14931	acl	bw011087
762297	OCHS 15465	acl	bw049007
762446	OCH 15835	acl	bw020096
762567	OCH 15825a	acl	bw011015
762567	OCH 15825a	acl	bw100063
762567	OCH 15825a	acl	bw100064
762821	SS 7202	acl	bw040004
762821	SS 7202	acl	bw040035
762821	SS 7202	acl	bw040036
761452	OCH 12089	alb	bw039001
761452	OCH 12089	alb	bw039003
761452	OCH 12089	alb	bw039004
762917	SSTH 7399	alb	bw071054
760645	HOFF 1533	chc	bw071192
760645	HOFF 1534	chc	bw071193
761080	FB 4001	cmm	bw0630301
761080	FB 4001	cmm	bw0630316
761090	FB 4025a	cmm	bw0330070
762454	URY 4	cmm	bw071242
762468	URY 22	cmm	bw071249
762468	URY 22	cmm	bw071262
761893	OCH 14154	dms	bw014027
761893	OCH 14154	dms	bw014028
761893	OCH 14154	dms	bw014030
761893	OCH 14154	dms	bw014032
	COR 14237	dms	E 11
762930	SSTS 7311	hro	bw040557
762930	SSTS 7311	hro	bw040558
761947	OCH 14268	inc	bw011114
761947	OCH 14268	inc	bw020148
761403	OCH 12032	mga	bw014015
761113	OCH 7613	rap	A 100
761586	OCH 13336	sgr	bw014024
761586	OCH 13336	sgr	bw014025

Nota: Las filas sombreadas de color celeste indican los genotipos resistentes a su vez poseen resistencia al tizón tardío de la papa.

Tabla 13. Cuadro resumen de los genotipos analizados con 7 cepas procedentes de diferentes países de América Latina (Biovar 2A/Filotipo II) a dos concentraciones: 1×10^8 y 5×10^7 ufc/g suelo. Las inoculaciones fueron realizadas en invernadero bajo condiciones controladas (28-30°C).

Conclusión	Número de genotipos
Seleccionados	52
Para Re-evaluación	21
Eliminados	89
Total Evaluado	162

Tabla 14. Número de entradas por especie seleccionadas por su resistencia a al menos 4 cepas de *R. solanacearum* en ambas dosis bajo condiciones de invernadero (20-32°C).

Especie	Acrónimo	Número de entradas evaluadas	Número de genotipos evaluados	Número de entradas seleccionadas
<i>Solanum acaule</i>	<i>acl</i>	41	373	27
<i>Solanum acaule f. incuyo</i>	<i>inc</i>	2	17	4
<i>Solanum albicans</i>	<i>alb</i>	10	36	2
<i>Solanum chacoense</i>	<i>chc</i>	3	25	6
<i>Solanum commersonii</i>	<i>cmm</i>	31	229	5
<i>Solanum demissum</i>	<i>dms</i>	7	203	2
<i>Solanum huarochiriense</i>	<i>hro</i>	2	33	2
<i>Solanum megistacrolobum</i>	<i>mga</i>	7	179	1
<i>Solanum raphanifolium</i>	<i>rap</i>	18	216	1
<i>Solanum sogarandinum</i>	<i>sgr</i>	8	62	2
TOTAL	10	129	1373	52

5.3. Tercer tamizado: Prueba de Infección Latente en Tubérculos con la cepa CIP204 Filotipo II / Biovar 2A / Raza 3 de *R. solanacearum*

Se llegó a evaluar 26 de los 52 genotipos seleccionados para la prueba de Infección Latente en Tubérculos (Tabla 15). Después de 4 meses de implantado el experimento, se seleccionaron 7 genotipos resistentes: 6 genotipos pertenecientes a la especie silvestre *Solanum acaule* (bw020053, bw020105, bw019005, bw011049, bw049007 y bw040036), y 1 genotipo perteneciente a la especie silvestre *Solanum chacoense* (bw071193). Estos genotipos fueron resistentes a la marchitez en planta y no mostraron infección latente ni en tallos ni en tubérculos, luego de ser evaluados usando técnicas serológicas altamente sensibles desarrolladas por el CIP (Figura 11, 12, 13 y 14).

Los genotipos bw071004, bw071036, bw071037, bw020076, bw020096, bw011080 (*S. acaule*); bw011114, bw020148 (*S. acule f. incuyo*) y bw071262 (*S. commersonii*), no presentaron síntomas visibles de marchitez bacteriana ni en tallos ni en tubérculos, sin embargo, mediante las pruebas serológicas se pudo detectar la infección latente en tallos y/o en tubérculos, por lo que fueron descartados al final del experimento (Figura 12, Figura 13, Tabla 15).

El genotipo bw039004, no presentó síntomas visibles de marchitez bacteriana en planta, pero si presentó infección latente en tallos y síntomas visibles de infección en tubérculos, por lo que también fue eliminado (Figura 12, Figura 13, Tabla 15).

Los 9 genotipos restantes, presentaron diversos niveles de susceptibilidad a las 7 cepas de *R. solanacearum*, tanto visible como latente, por lo que también fueron eliminados (Tabla 15). Se desarrolló un nuevo procedimiento para determinar la presencia de infección en tubérculos en especies de papa silvestre.

Tabla 15. Genotipos de papas silvestres analizados para su resistencia a la infección latente en tubérculos después de la inoculación con la cepa CIP204 de *R. solanacearum* a 5×10^7 ufc/g suelo bajo condiciones ambientales durante los meses de Mayo a Agosto en Lima (14-17°C).

Número CIP	Número de Colector	Código Bacterial Wilt	% de Marchitez Bacteriana	% de Infección Latente en Tallos	% de Tubérculos con Síntomas	% de Infección Latente en Tubérculos	% de Plantas Infectadas (Latente y Visible)
<i>S. acaule</i> Bitter.							
760213	HHCH 4243	bw071004	0	10	0	0	10
760213	HHCH 4243	bw071012	10	22	0	0	30
760346	HHCH 5081	bw071036	0	10	0	0	10
760346	HHCH 5081	bw071037	0	10	0	0	10
761624	OCH 13545	bw020030	20	25	30	29	60
761624	OCH 13545	bw020037	10	0	0	0	10
761803	OCH 13794	bw020053	0	0	0	0	0
761824	OCH 13819	bw020076	0	10	0	10	10
762567	OCH 15825a	bw100064	10	22	0	20	30
762446	OCH 15835	bw020096	0	10	0	0	10
761288	OCHS 11825	bw020105	0	0	0	0	0
761292	OCHS 11831	bw019005	0	0	0	0	0
762140	OCHS 14926	bw011049	0	0	0	0	0
762145	OCHS 14931	bw011080	0	11	0	0	10
762297	OCHS 15465	bw049007	0	0	0	0	0
762821	SS 7202	bw040035	10	0	0	0	10
762821	SS 7202	bw040036	0	0	0	0	0
<i>S. acaule</i> subsp. <i>acaule</i> f. <i>incuyo</i> Ochoa.							
761947	OCH 14268	bw011114	0	11	0	0	10
761947	OCH 14268	bw020148	0	10	0	0	10
<i>S. albicans</i> Ochoa.							
761452	OCH 12089	bw039004	0	20	10	11	20
<i>S. chacoense</i> Bitter.							
760645	HOFF 1533	bw071192	20	13	0	40	40
760645	HOFF 1533	bw071193	0	0	0	0	0
<i>S. commersonii</i> Dunal.							
762454	URY 4	bw071242	10	0	0	0	10
762468	URY 22	bw071262	0	10	0	10	10
<i>S. demissum</i> Lindl.							
	COR 14237	E 11	10	0	20	0	20
<i>S. raphanifolium</i> Cardenas & Hawkes.							
	OCH 7613	A 100	20	13	10	13	30
CONTROLES							
<i>S. acaule</i> susceptible		bw020039	50		60	75	90
		bw020040	30		30	29	50
		bw020135	40		20	13	40
Variedades		Yungay	80		70	0	80
		Revolución	90		60	25	90
		Cruza 148	80	0	70	0	80

Las filas sombreadas de color lila indican los genotipos seleccionados

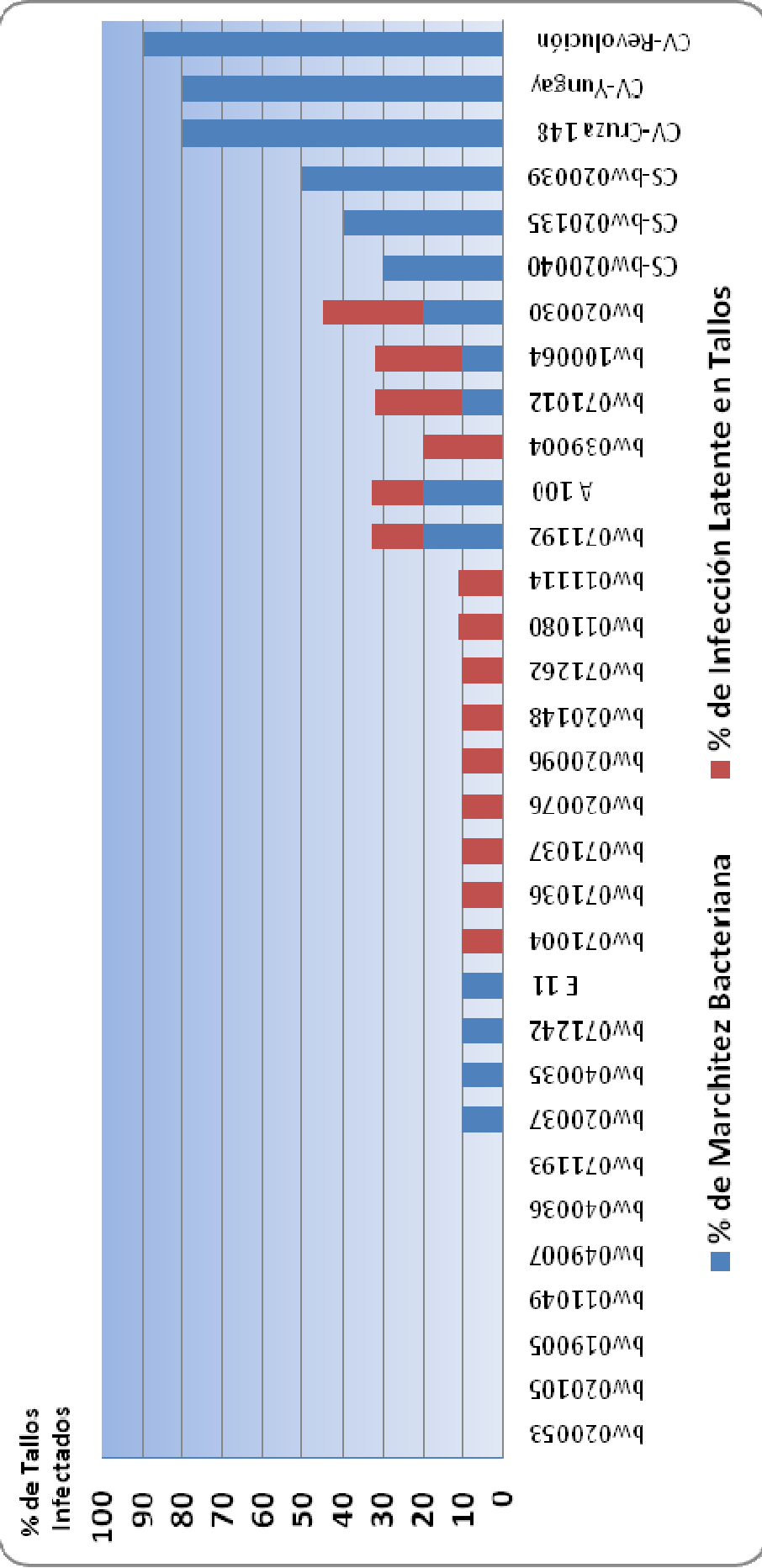


Figura 11. Porcentaje de Plantas Infectadas en la prueba de Infección de Tubérculos evaluados después de la inoculación con la cepa CIP204 de *R. solanacearum* a 5×10^7 ufc/g suelo bajo condiciones ambientales durante los meses de mayo a agosto del 2006 en Lima (14-17°C).

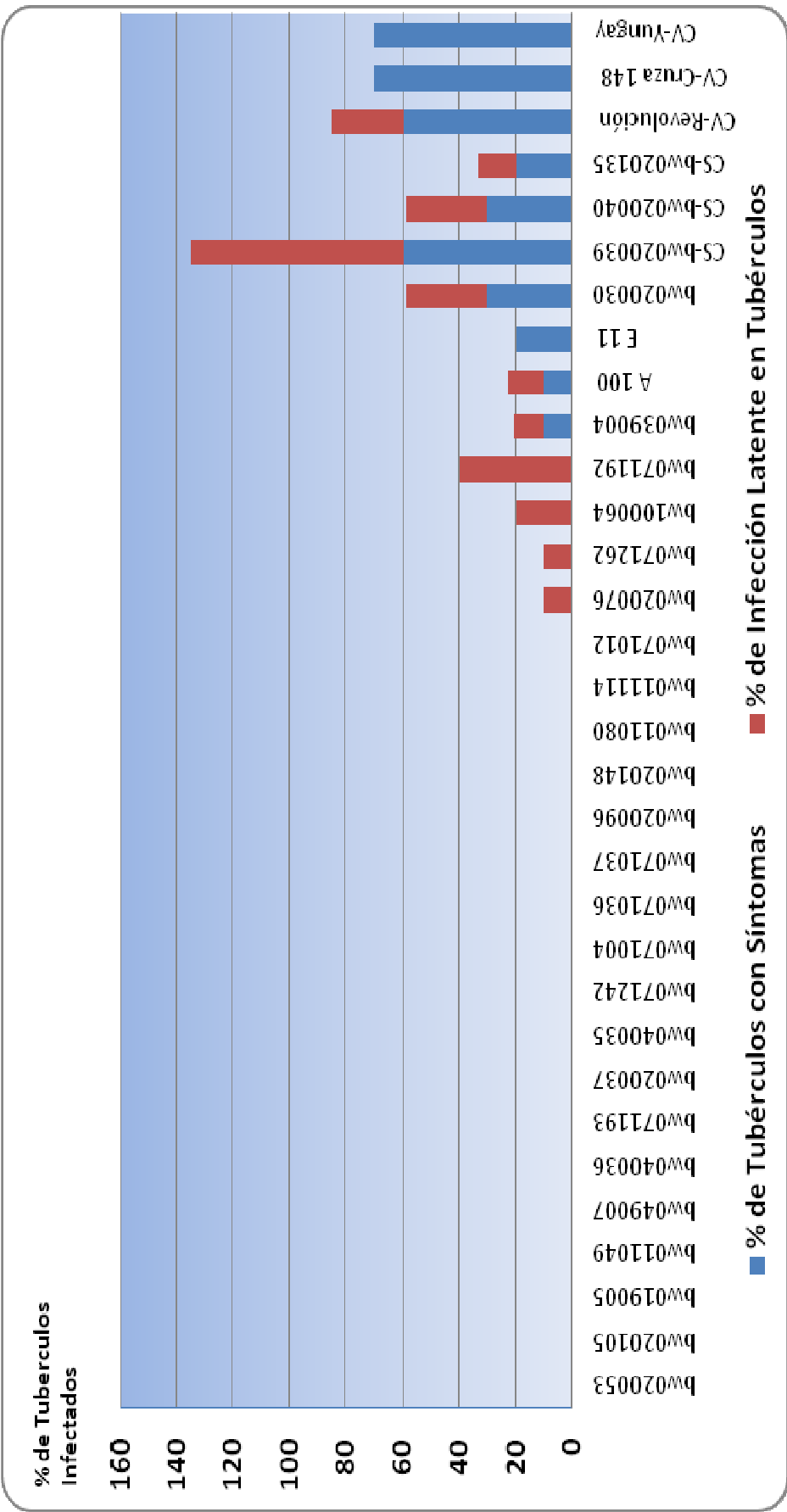


Figura 12. Porcentaje de tubérculos infectados en la prueba de Infección de Tubérculos evaluados después de la inoculación con la cepa CIP204 de *R. solanacearum* a 5×10^7 ufc/g suelo bajo condiciones ambientales durante los meses de mayo a agosto del 2006 en Lima (14-17°C).

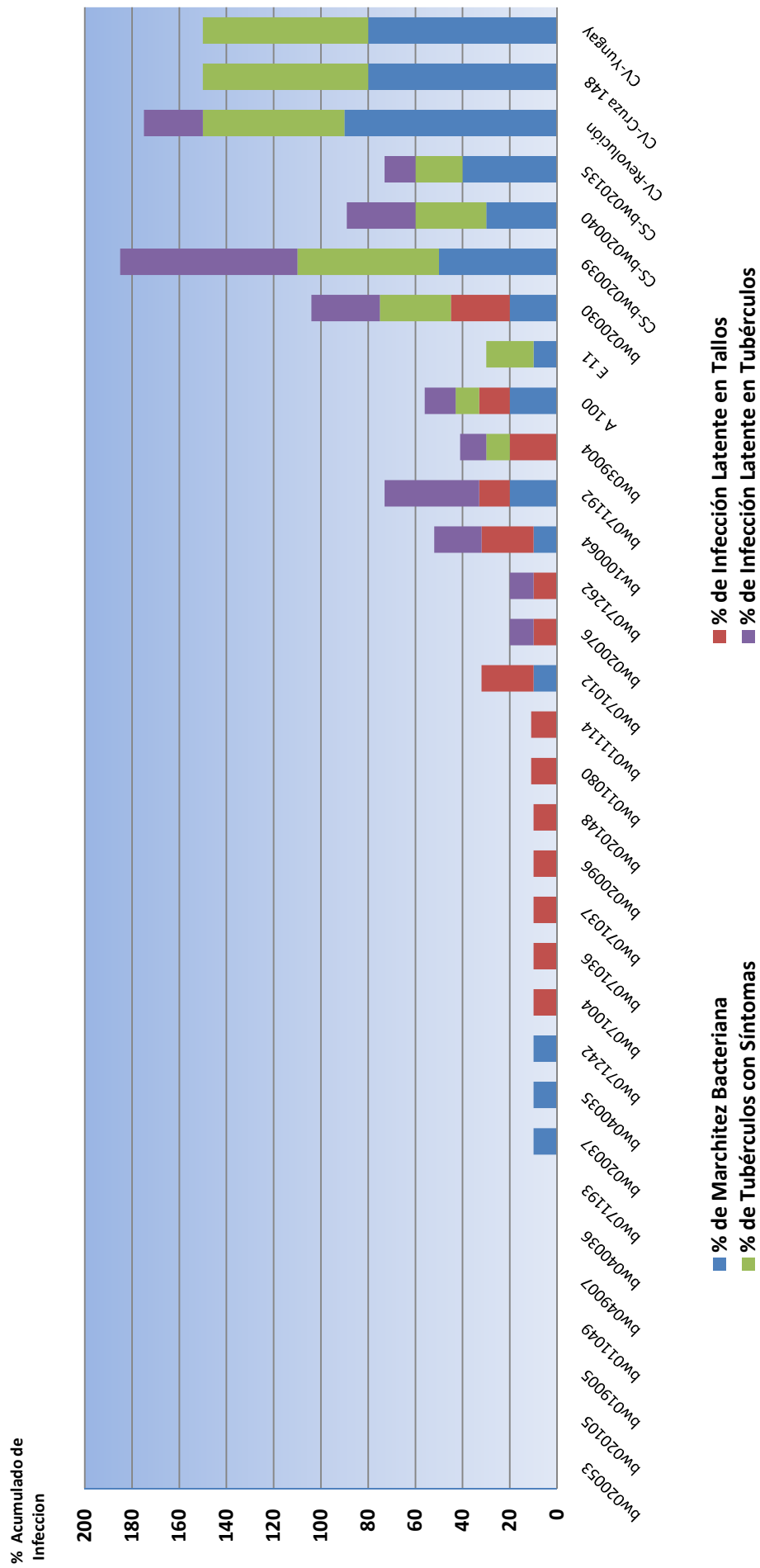


Figura 13. Porcentaje acumulado de infección en la prueba de Infección de Tubérculos evaluados después de la inoculación con la cepa CIP204 de *R. solanacearum* a 5×10^7 ufc/g suelo bajo condiciones ambientales durante los meses de mayo a agosto del 2006 en Lima (14-17°C).

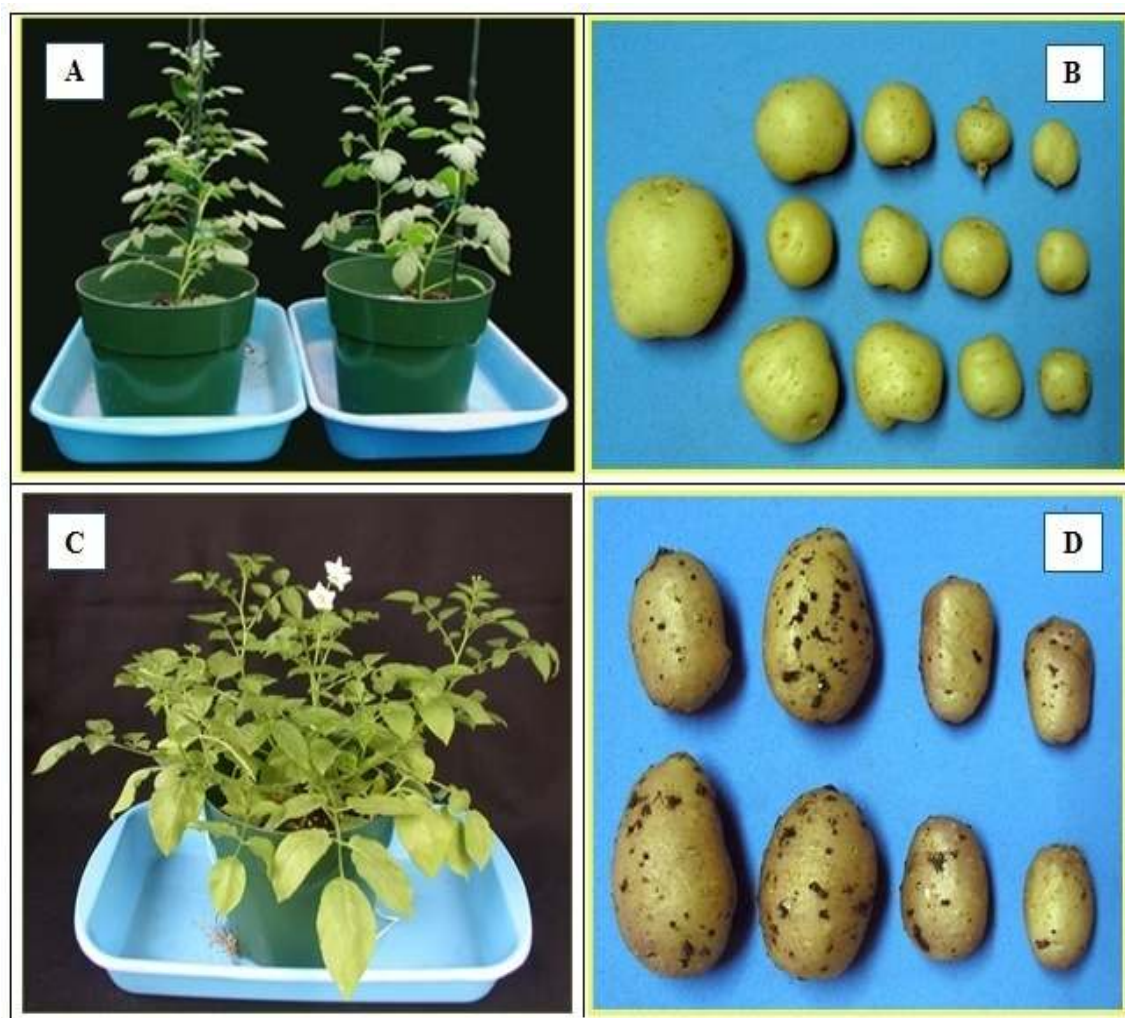


Figura 14. A) Planta y B) tubérculos del Genotipo BW049007 de *S. acaule* resistente a *R. solanacearum*; C) Planta y B) tubérculos del Genotipo BW0071193 de *S. chacoense* resistente a *R. solanacearum*.

VI. DISCUSIÓN

6.1. Primer tamizado: Evaluación de la resistencia a la cepa CIP204 Filotipo II/ Biovar 2A/ Raza 3 de *R. solanacearum*.

De un total de 4472 genotipos analizados en el primer tamizado, se seleccionaron 178 genotipos por su resistencia a la cepa CIP204, pertenecientes a 83 entradas y 30 especies diferentes. Esta cantidad representa el 4% de los genotipos analizados. Del total de seleccionados, 68 genotipos (38.2%), pertenecen a la especie *Solanum acaule* Bitter, lo cual confirma estudios anteriores donde se reporta su resistencia no solo a *R. solanacearum* sino también a otros factores tanto bióticos como abióticos, entre los que resalta su resistencia a las heladas (Correl, 1962; Hawkes & Hjerting, 1989; Hawkes, 1990; Bamberg *et al.*, 1994; Estrada, 1999). Por otro lado, de acuerdo a Mastenbroek (1956), la resistencia a heladas se hereda en muchos casos, como un factor dominante, especialmente cuando se utiliza la especie silvestre *S. acaule*.

Dentro del pool genético analizado en el primer tamizado se evaluaron 30 especies recientemente colectadas que nunca habían sido evaluadas. Las demás especies habían sido evaluadas en los 70's y 80's usando técnicas de evaluación menos sensibles y sin evaluar adecuadamente la reacción a la infección latente (Boshou, 2004). 10 de las 30 especies reportadas como resistentes a la cepa CIP204 (Filotipo 3/Bv 2A) no habían sido evaluadas anteriormente y por lo tanto nunca habían sido reportadas como resistentes: *S. acaule* forma *incuyo*, *S. albicans*, *S. cajamarquense*, *S. cantense*, *S. chiquidenum*, *S. huarochiriense*, *S. piure*, *S. sawyeri*, *S. sogarandinum* y *S. tuberosum* subsp. *andigena* (maleza primitiva). Si se confirman estas posibles nuevas fuentes de resistencia a la marchitez bacteriana de la papa, sería importante para los futuros programas de mejoramiento ya que como reportó Estrada

(1999), la mayoría de las especies silvestres se pueden cruzar con las especies cultivadas debido a que no tienen diferencias básicas estructurales en sus cromosomas. No es difícil lograr el apareamiento cromosómico entre diferentes especies. Esta característica es definitiva para obtener fertilidad y facilitar la transferencia de genes de los híbridos a las generaciones siguientes.

Por otro lado, dentro de los 33 genotipos resistentes al tizón tardío seleccionados, las especies con mayor número de genotipos son *S. demissum* y *S. megistacrolobum*. Plucknett *et al* (1992) reportaron a *S. megistacrolobum* como resistente a heladas, sin embargo no hay reportes anteriores de esta especie como resistente a *R. solanacearum*. Con respecto a *S. demissum*, esta especie ha sido ampliamente estudiada y reportada como resistente no sólo a *R. solanacearum* sino también al Tizón tardío de la papa, lo que confirma los resultados encontrados en nuestros experimentos (Agricultural Experiment Station, 1965; Martin, 1979; French, 1985; CIP Annual Report, 1987; Bamberg *et al.*, 1994; Hartman & Elphinstone, 1994; Wilkinson *et al.*, 1994).

6.2. Segundo tamizado: Evaluación de la estabilidad de la resistencia con 7 cepas de *R. solanacearum* Filotipo II / Biovar 2A / Raza 3

Para asegurar la estabilidad de la resistencia a la marchitez bacteriana de la papa, los genotipos seleccionados en el tamizado 1 fueron re-evaluados con las cepas más virulentas de *R. solanacearum* y que representan la diversidad genética que existe dentro de la Raza 3/ Biovar 2A en América Latina. Debido a que estas cepas son cepas especializadas en papa y se encuentran presentes tanto en las zonas tropicales como en las zonas templadas, nos permiten tener un panorama amplio con respecto a la estabilidad de resistencia de estos genotipos.

Las especies *S. acaule subsp. acaule f. incuyo*, *S. albicans*, *S. huarochiriense* y *S. megistacrolobum* reportadas con resistencia estable en este trabajo, no habían sido reportadas anteriormente como resistentes, lo que constituye un nuevo aporte con respecto a fuentes de resistencia para esta enfermedad .

Nuevamente, la mayoría de genotipos seleccionados pertenecen a la especie *S. acaule* Bitter, confirmando trabajos anteriores (Correl, 1962; Hawkes & Hjerting, 1989; Hawkes, 1990; Bamberg et al., 1994; Estrada, 1999).

Las especies silvestres *S. chacoense*, *S. commersonii*, *S. demissum*, *S. raphanifolium* y *S. sogarandinum* ya habían sido reportadas como resistentes en diversos trabajos anteriores, inclusive *S. commersonii*, *S. demissum* han sido utilizadas en diferentes programas de mejoramiento para transferir resistencia a heladas a las especies cultivadas (Correl, 1962; Martin, 1979; French, 1985; Hawkes & Hjerting, 1989; Hawkes, 1990; Bamberg et al., 1994; Hartman & Elphistone, 1994 Estrada, 1999).

Las entradas HHCH 4243 (CIP 760213), OCH 13545 (CIP 761624), OCH 14154 (CIP 761893), OCH 15825a (CIP 762567) y SS 7202 (CIP 762821) presentaron el mayor porcentaje de genotipos seleccionados, lo que nos sugiere que existe una alta probabilidad de encontrar confiables fuentes de resistencia en estas entradas. Además, si se puede confirmar la resistencia a la MB y al tizón tardío de la entrada OCH 14154 (CIP 761893), esto representaría un importante avance para futuros programas de mejoramiento.

Los resultados obtenidos a partir de los cultivares usados como testigos en cada fecha de inoculación reprodujeron la respuesta esperada, siendo el cultivar Cruza 148 moderadamente resistente, mostrando bajos niveles de infección en planta, así mismo el cultivar susceptible 'Revolución', mostró una alta susceptibilidad a casi todas las

cepas, demostrando ser un buen testigo susceptible (Martin 1979, Schmiediche, 1985; Aley *et al.* en 1994; Anguiz & Mendoza, 1997).

6.3. Tercer tamizado: Prueba de Infección Latente en Tubérculos con la cepa CIP204 Filotipo II / Biovar 2A / Raza 3 de *R. solanacearum*

Algunos autores (Ciampi *et al.*, 1980; Granada, 1982) señalan que cuando se cultiva material resistente en suelos naturalmente infestados, pueden producirse tubérculos con infección latente.

Se evaluó la infección en tubérculos bajo condiciones menos severas (5×10 ufc/g suelo) durante el invierno en Lima ($14\text{--}21^\circ\text{C}$) que permite la tuberización de las plantas silvestres. Bajo estas condiciones, es muy probable que se presente la infección latente, ya que son condiciones menos conductivas para la enfermedad.

Granada (1982) reporta que no siempre hay correlación entre el desarrollo de síntomas aéreos con la inducción de la infección en los tubérculos; y Torres (1984) menciona que en plantas que mostraban tubérculos con exudación vascular, no se determinó infección latente en aquellos tubérculos aparentemente sanos. Probablemente el desarrollo escalonado de los tubérculos en la misma planta determina que haya escape de infección en algunos tubérculos. Por esta razón, se procesaron todos los tubérculos producidos por planta en sub-muestras dependiendo el número y tamaño de los tubérculos producidos, de esta manera se evitó el escape de infección en tubérculos.

La selección de 6 genotipos resistentes de *S. acaule*, con 0% de infección en planta y tubérculo, tanto visible como latente, nos indica que esta especie es la que

ofrece mejores perspectivas para futuros programas de mejoramiento a la MB. Esto confirma estudios anteriores donde se reporta su resistencia no solo a *R. solanacearum* sino también a otros factores tanto bióticos como abióticos (Correl, 1962; Hawkes & Hjerting, 1989; Hawkes, 1990; Bamberg *et al.*, 1994; Estrada, 1999). Schmiediche en 1992 reporta que *Solanum acaule* es altamente resistente al frío y posee otras características que pueden ser útiles para mejoramiento. Esto incluye su resistencia al virus X y su habilidad de cruzarse con algunas especies mexicanas (las cuales son genéticamente diferentes del pool genético sudamericano) sirviendo como un puente para el uso de las especies mexicanas.

Por otro lado, el genotipo seleccionado de *Solanum chacoense*, nos sugiere que esta especie también posee un alto valor para los programas de mejoramiento ya que en estudios anteriores ha sido reportada con ciertos niveles de resistencia a una variedad de patógenos, entre los que destaca *Phytophthora infestans* y *Ralstonia solanacearum* (Thung, 1947; Correl, 1962; Hawkes & Hjerting, 1969; Hawkes, 1990; Bamberg *et al.*, 1994; Estrada, 1999).

Los resultados obtenidos a partir de los genotipos silvestres usados como testigos susceptibles en este ensayo (bw020039, bw02040 y bw020135), reprodujeron la respuesta esperada, siendo el genotipo bw020039 el que mostró una alta susceptibilidad bajo estas condiciones, demostrando ser un buen testigo susceptible. El cultivar Cruza 148, utilizado como testigo moderadamente resistente, mostró el mismo nivel de susceptibilidad que los testigos susceptibles Yungay y Revolución, demostrando no tener mayor resistencia a la marchitez bacteriana, bajo las condiciones del experimento.

Se desarrolló un nuevo procedimiento para determinar la presencia de infección en tubérculos en especies de papa silvestre.

Esta es la primera evidencia de altos niveles de resistencia a la Marchitez Bacteriana existente en el germoplasma de la papa.

VII. CONCLUSIONES

- Se desarrolló una nueva metodología para determinar la resistencia de especies silvestres a la infección en tubérculos causada por *Ralstonia solanacearum*.
- Es la primera evidencia de que altos niveles de resistencia estable, tanto a la marchitez como a la infección en tubérculos, existe en el germoplasma de papa. La ausencia del patógeno en el tallo y los tubérculos es extremadamente importante. Si la bacteria invade el sistema vascular de la planta, formas latentes de la enfermedad pueden ser transferidas a los tubérculos-semilla y de esta manera mantener el ciclo recurrente de infección en los campos de los agricultores.
- Se identificaron dos fuentes independientes de resistencia a la marchitez y a la infección latente: *Solanum acaule* y *Solanum chacoense*, las cuales son las especies silvestres más promisorias para futuros programas de mejoramiento. Las posibilidades de desarrollar una resistencia estable por largo tiempo son grandes. Además el uso de 7 cepas de *R. solanacearum* puede incrementar la probabilidad de que las variedades de papa desarrolladas partir de estas fuentes tengan una resistencia más amplia al patógeno a nivel mundial.

VIII. RECOMENDACIONES

- Asegurarse de que las plantas posean un adecuado desarrollo radicular antes de la inoculación.
- Utilizar un agitador para mantener la concentración del inóculo uniforme y evitar una variación de la concentración a la hora de inocular las plantas.
- Tratar de uniformizar el tiempo de brotado de los tubérculos para evitar variaciones en el tamaño de las plantas.
- Siempre reactivar la cepa inyectándola primero en un control, antes de preparar el inóculo para el experimento.
- Sembrar los controles una semana después de sembrar los genotipos silvestres, ya que crecen más rápido.
- Rotular adecuadamente los genotipos y las cepas a inocular para evitar cualquier confusión.
- Pesar el sustrato para la prueba de Infección en tubérculos antes del trasplante.
- Colocar las estacas de bambú a la hora del trasplante para evitar dañar la planta posteriormente, lo cual podría afectar los resultados.

- Es necesario confirmar la resistencia al menos 3 veces debido a posibles escapes del patógeno por un inadecuado desarrollo de las raíces o por una variación en la susceptibilidad de la planta debido a características fisiológicas.
- Los mecanismos y la base de la resistencia genética debe ser estudiados para identificar los genes de resistencia con la meta final de transferir la resistencia a la Marchitez Bacteriana de la Papa a variedades comerciales cultivadas por los agricultores en los países en desarrollo.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION, University of Wisconsin-Madison. 1965. Inventory of Tuber-bearing *Solanum* species. Cooperating with the U.S. Department of Agriculture and State Agricultural Experiment Stations throughout the United States. Bulletin 533. 69 pp.

ALEY, P., E.R. FRENCH, U. NYDEGGER. 1994. Métodos de inoculación con *Pseudomonas solanacearum* en invernadero para seleccionar clones en papas resistentes. Fitopatología. 29(1):20.

ANGUIZ CHUQUICHANCA, R.J. 1993. Tesis para optar el Grado de Magister Scientiae. Habilidad combinatoria general (HCG) y específica (HCE) para resistencia a la marchitez bacteriana (*Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith) en papas autotetraploides inmunes a los virus X e Y. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima (Perú). 69 pp.

ANGUIZ, R.J. & MENDOZA, H.A. 1997. General and specific combining abilities for resistance to bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith) in PVX and PVY immune autotetraploid potatoes. Fitopatologia 32(1): 71-80.

BAMBERG, J.B., M.W. MARTIN & J.J. SCHARTNER, 1994. Elite Selections of Tuber-bearing *Solanum* species germplasm. Inter-Regional Potato Introduction Station, NRSP-6, Sturgeon Bay, USA. 56 pp.

BICAMUMPAKA M. & DEVOUX, A. 1984. Programme de Selection au Rwanda pour l'obtention des variétés résistantes au mildios (*P. infestans*) et a la bacteriose (*P. solanacearum*). EAPR IX Conf. Trisann, pp 330-331.

BOSHOU, L. 2004. A broad review and prospective on breeding for resistance to bacterial wilt. In C. Allen, P. Prior, & A. C. Hayward (Eds.), Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex (pp. 225–238). St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society.

CIAMPI, L., L. SEQUEIRA & E. R. FRENCH. 1980. Latent infection of potato tubers by *Pseudomonas solanacearum*. American Potato Journal 57:307-317.

CIAMPI, L. & L. SEQUEIRA. 1980. Multiplication of *Pseudomonas solanacearum* in resistant potato plants and the establishment of latent infections. American Potato Journal, 57: 319 – 329.

CIP.Annual Report. 1977. Centro Internacional de la Papa. Lima, Peru. 105 pp.

CIP.Annual Report.1980. Centro Internacional de la Papa. Lima, Peru. 100 pp.

CIP.Annual Report.1985. Centro Internacional de la Papa. Lima, Peru.95 pp.

CIP.Annual Report.1986. Centro Internacional de la Papa. Lima, Peru.90 pp.

CIP Informe Anual 86-87. Centro Internacional de la Papa. Lima, Peru.90 pp.

CIP.Annual Report.1987. Centro Internacional de la Papa. Lima, Peru.100pp.

CIP. Annual Report. 1989. Centro Internacional de la Papa. Lima, Peru. 103 pp.

CIP.Annual Report.1990. Internacional de la Papa. Lima, Peru.105 pp.

CIP.Program Report.1995. Centro Internacional de la Papa. Lima, Peru. 98 pp.

CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP). 1995. La papa en cifras. Compendio de informacion clave y analisis para 30 importantes paises productores de papa.

COOK, D. & L. SEQUEIRA. 1994. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetics methods. In: Bacterial Wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum* (eds. Hayward, A.C. and Hartman, G.L.). PP. 77-93. CAB International, Walingford (UK).

CORRELL, D.S. 1962. The potato and its wild relatives. Renner (USA). Texas Research Foundation.578 pp.

DELGADO, 1995. Respuesta DE Clones avanzados de papa al ataque de la marchitez bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) en la zona andina de Piura. Universalia 2(1):1-43.

ESTRADA RAMOS, N. 1999. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. Programa de Investigación de la papa (PROINPA). La Paz (Bolivia); Centro de Información para el Desarrollo (CID); Centro Internacional de la Papa (CIP). 372 pp.

FRANCO E. & SMITH, E. 1985. Adopción y difusión de variedades de papa en el departamento de Cajamarca (Adoption and spread of potato varieties in Cajamarca Department-Peru). Ciencias Sociales. Documento Nro 1985-1. Internatuional Potato Center. pp 30.

FRENCH, E.R. & I. A. HERRERA. 1971. La marchitez bacteriana de la papa. Ofic. Inf. Técnica. Min. Agric. Divulgación 34. Lima, Perú. 6 pp.

FRENCH, E.R.& DE LINDO,1982. Resistance to *Pseudomonas.solanacearum* in potato: specificity and temperature sensitivity. *Phytopathology* 72: 1408-1412.

FRENCH, E.R. (1985) Multiple disease resistance in potato cultivars with *Solanum phureja* and *S. demissum* background. *Phytopathology* 75, 1288.

FRENCH, E.R. 1986. Efficacy of five methods of inoculating potato plants with *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 76:1078 (Abstr.).

FRENCH, E.R. & U. NIDEGGER.1987. Mass screening procedures for resistance to *Pseudomonas solanacearum*. En: *Bacterial Disease of the Potato. Report of the Planning Conference on Bacterial Diseases of the Potato 1987*.Centro Internacional de la Papa. pp 15-17.

FRENCH, E.R & L. SEQUEIRA.1988. Additional sources of resistance to Bacterial Wilt. En: *Bacterial Disease of the Potato. Report of the Planning Conference on Bacterial Diseases of the Potato 1987*.Centro Internacional de la Papa. pp 29-33.

FRENCH, E. R. 1993a. Control integrado de la marchitez bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) de la papa en las Americas. Compendios: XVI Reunión de la ALAP, Santo Domingo (Dominican Republic). pp. 60.

FRENCH, E. R. 1993b.Control integrado de la marchitez bacteriana de la papa causada por el Biovar 2A/Raza 3 de *Pseudomonas solanacearum*. En *memorias del taller sobre enfermedades bacteriana de la papa*. Brasilia, Brasil, pp. 39-41.

FRENCH, E. R. 1994. Strategies for integrated control of bacterial wilt of potatoes. In: Bacterial Wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum* (eds. Hayward, A.C. and Hartman, G.L.). PP.199-207. CAB International, Walingford (UK).

FRENCH, E. R. 1996a. Integrated control of bacterial wilt of potato. In Bacterial Wilt: Training Manual. International Potato Center eds. Lima Perú. pp 1 - 8.

FRENCH, E.R., P. ALEY, E. TORRES & U. NIDEGGER. 1996b. Diversity of *Ralstonia solanacearum* In Perú and Brazil. In Bacterial Wilt Manual. International Potato Center (CIP). Lima, Section 9, 13 pp.

FRENCH, E.R., R. ANGUIZ & P. ALEY, 1998. The usefulness of potato Resistance to *Ralstonia solanacearum*, for the integrated control of bacterial wilt. In: Prior, P., C. Allen, and J. Elphinstone (eds.). Bacterial wilt disease: Molecular and ecological aspects. INRA Edition. Springer Verlag, Berlin, Germany. pp. 381-385.

FOCK, I., COLLONNIER, C., PURWITO A., LUISETTI J., SOUVANNAVONG V., VEDEL F., SERVAES, A., AMBROISE, A., KODJA, H., DUCREUX, G., & D SIHACHAKR. 2000. Resistance to bacterial wilt in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. Plant Sci. 160 (1):165-176.

FOCK, I., J. LUISETTI, C. COLLONNIER, F. VEDEL, G. DUCREUX, H. KODJA, AND D. SIHACHAKR. 2005. *Solanum phureja* and *S. stenotomum* are sources of resistance to *Ralstonia solanacearum* for somatic hybrids of potato. In: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. C. Allen, P. Prior, and A.C. Hayward (eds.), St. Paul, MN, USA; Am Phytopath Soc (APS Press), pp. 253-259.

GRANADA, G.A. 1982. Potencial de Inoculo y su determinacion. Taller de Avances de la Marchitez Bacteriana de la Papa en America Latina. Brasilia.

GRANADA, G.A. & L. SEQUEIRA. 1983. A new selective medium for *Pseudomonas solanacearum*. Plant Disease 67: 1084-1088.

GONZALEZ, L.C., L. SEQUEIRA & P.R. ROWE. 1973. A root inoculation technique to screen potato seedlings for resistance to *Pseudomonas solanacearum*. Amer Potato J. 50:96-104.

HARTMAN, G.L.; ELPHISTONE, J.G. (1994) Advances in the control of *Pseudomonas solanacearum* race 1 in major food crops. In: Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum* (Ed. by Hayward, A.C.; Hartman, G.L.), pp. 157-177. CAB International, Wallingford, UK.

HAWKES, J. G. & J. P. HJERTING. 1989. The Potatoes of Bolivia. Their Breeding Value and Evolutionary Relationships. Clarendon Press. Oxford. 472 pp.

HAWKES, J. G. 1990. The Potato: evolution, biodiversity and genetic resources. Belhaven press, London, U.K. 259 pp.

HAWKES, J. G. 1994. Origins of cultivated potatoes and species relationships. En: Potato Genetics. J.E. Bradshaw y G.R. Mackay (eds.). p 3-42.

HAYWARD, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 27: 265-277.

HAYWARD, A.C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* *Annual Review of. Phytopathology*, 29 : 65 - 87.

HE, L., SEQUEIRA, L. & A. KELMAN. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. *Plant Disease* 67:1357-1361.

HERRERA, I. A., VASQUEZ, F. DE LA PUENTE & FRENCH, E. R. 1977. Caxamarca (Chaucha mejorada), una variedad de papa resistente a la marchitez bacteriana y a la racha. Min. Alimentación (Perú. D.G.I. Informe Especial No. 49. 5 pp.

HOOKE, W. J. 1980. Compendio de enfermedades de la papa. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, 166 pp.

HORTON, D. 1992. [Potatoes: Production, marketing and program]. La papa: Producción, comercialización y programas. Montevideo (Uruguay). Ed. Hemisferio Sur; Centro Internacional de la Papa (CIP). 260 pp.

<http://faostat.fao.org/faostat/collections?version=ext&hasbulk=0&subset=agriculture>

JACKSON M.T. & GONZALEZ, L.C. 1979. Persistence of *Pseudomonas solanacearum* in an inceptisol in Costa Rica, pp 66-71. En: Development in control of potato bacterial diseases. Report of a Planning Conference, held by the International Potato Center. Lima, Peru. 137 pp.

JAWORSKY, C.A., S.C. PHATAK, R.D GITAITIS & S.R.GHATE.1987.GA 244-15 BWT, GA 7-1 BWT, and GA 12-4 BWT bacterial wilt-tolerant *Solanum* germplasm. *Hort Science* 22:963.

KELMAN, A.1953. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. North Carolina Agricultural Experimental Station Technical Bulletin 99: 194 pp.

KELMAN, A.1954. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. North Carolina Agricultural Experimental Station. *Technical bulletin*, 99 : 194.

KELMAN , A. & SEQUEIRA L. 1965. Root-to-Root spread of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 29:65-87.

KELMAN, A, G.L. HARTMAN & AC. HAYWARD. 1994. Introduction in Bacterial Wilt. In: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum* (eds. Hayward, AC. and G.L. Hartman). CAB International, Wallingford (UK). pp 1-8.

KHURANA, S.M.P., J.S. MINHAS & S.K. PANDEY. 2003. The Potato: Production and utilization in sub-tropics. New Delhi (India). Mehta Publishers.446 pp.

KIM-LEE Heiyoung, HONG Y., MOON J. , EIM M., & CHO H. M. 2005. Bacterial wilt resistance in the progenies of the fusion hybrids between haploid of potato and *Solanum commersonii*. *Am J Potato Res* 82:129-137.

KRIEG N.R & HOLD J.G. 1984.*Bergey's Manual of systematic bacteriology Vol. 1. Williams and Wilkins Baltimore/London. 1–943.*

KUCHAREK, T, 1998. Bacterial Wilt of Row Crops in Florida.Circular-1207.Florida Cooperative Extension Service/Institute of Food and Agricultural Sciences/University of Florida.

LAFERRIERE L., HELGESON J.P., ALLEN C. 1998. *Solanum tuberosum-commersonii* somatic hybrids resistant to Brown caused by *Ralstonia solanacearum* In: Prior, P., C. Allen, and J. Elphinstone (eds.). Bacterial wilt disease: Molecular and ecological aspects. INRA Edition. Springer Verlag, Berlin, Germany. pp. 316-321.

Li, W.R., TAN Y.J.. 1984. Inoculation techniques for groundnut bacterial wilt. Oil Crops China. 2:77-81.

Linneo, C. 1753. Species plantarum. Holmiae, Estocolmo.

LIAO, B.S., Z.H. SHAN, N.X. DUAN, Y.J. TAN, Y. LEI, D. LI, & V.K. MEHAN. 1998. Relationship between latent infection and groundnut Bacterial Wilt resistance.

LOPES, C.A., A.M. QUEZADO-SOARES, J.A. BUSO & P.A. MELO. 1998. Breeding for resistance to Bacterial Wilt of potatoes in Brazil. In: Prior, P., C. Allen, and J. Elphinstone (eds.). Bacterial wilt disease: Molecular and ecological aspects. INRA Edition. Springer Verlag, Berlin, Germany. pp. 290-293.

MARTIN, C. & E. R. FRENCH. 1977. Informe annual. Centro Internacional de la Papa.

MARTIN, C. 1979. Role of indigenous vegetation and crops in persistence of *Pseudomonas solanacearum*. En: Development in control of Potato diseases. Report of a Planning Conference held by the International Potato Center. P 63-65. Lima, Peru. 137 pp.

MARTIN, C. & E. R. FRENCH. 1985. La marchitez Bacteriana de la Papa. Manual de Enfermedades de la Papa. Unidad Técnica de Capacitación 4 (TTU). CIP, Lima - Peru. Fasc 1.1, 9 pp.

MARTIN, C. & E. R. FRENCH.1996. La Marchitez Bacteriana de la papa. En Marchitez Bacteriana: Manual de capacitación del Centro Internacional de la Papa. Eds. Lima, Perú, pp. 1-10.

MASTENBROEK, C. (1956). Some experiences in breeding frost resistant potatoes. *Euphytica* 5:289-297.

MEHAN, V.K., B.S. LIAO. 1994. Groundnut bacterial wilt: past, present and future. En: Groundnut bacterial wilt in Asia, proceedings of the Third Working group Meeting (eds. Mehan V.K. y D. McDonald).OCRI, Wuhan, China, pp 67-88.

NAPIERE C.M. & QUIMI A.J. 1980. Influence of root-knot nematode on bacterial wilt severity in tomato. *Annals of Tropical Research* 2, 29–39.

NAVARRA, R. & J.L. ZAPATA. 1984. Algunos trabajos con *Pseudomonas solanacearum* realizados en Colombia. En: Marchitez Bacteriana de la Papa (*Pseudomonas solanacearum*) en América Latina. Centro Internacional de la Papa. Lima. Perú.pp:17-19.

NIELSEN, L. W., & F. L. HAYNES.1960. Resistance in *Solanum tuberosum* to *Pseudomonas solanacearum* . *Am. Potato J.* 37:260-267.

OCHOA, C. M. 1980. Apuntes de clase, Curso: Mejoramiento de tuberíferos andinos. Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). Lima, Perú.

OCHOA, C., AND P. SCHMIEDICHE.1983. Systemic exploitation and utilization of wild potato germplasm. In *Research for the potato in the year 2000*, ed. W. J. Hooker, 142-4.Lima.

PLUCKNETT, D. L.; WILLIAMS, J. T.; SMITH, N.; ANISHETTY, N. N. 1992. Los bancos genéticos y la alimentación mundial. San José. Costa Rica, IICA pp: 171-188.

PRIOR, P., V. GRIMAUULT & J. SCHMIT. 1994. Resistance to Bacterial Wilt (*Pseudomonas solanacearum*) in tomato: present status and prospects. En: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum* (eds. Hayward, AC. and G.L. Hartman). CAB International, Wallingford (UK), pp 209-223.

PRIOR, P. & M. FEGAN, 2005. Diversity and molecular detection of *Ralstonia solanacearum* race 2 strains by multiplex PCR. En: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. C. Allen, P. Prior and A.C. Hayward (Eds.). APS Press, St. Paul, Minnesota USA, pp 405-414.

PRIOU, S., P. ALEY, E. CHUJOY, B., LEGAMA & E. FRENCH. 1999a. Serie de diapositivas del CIP para capacitación iv-3: Control Integrado de la Marchitez Bacteriana de la Papa. Centro Internacional de la Papa. Lima (Perú).

PRIOU, S., L. GUTARRA & P. ALEY. 1999b. Highly sensitive detección of *R. solanacearum* in latently infected Potato tubers by post-enrichment ELISA on nitrocellulose membrane. Bulletin EPPO/OEPP 29:117-125.

PRIOU, S., L. GUTARRA, H. FERNÁNDEZ & P. ALEY. 1999c. Sensitive detection of *R. solanacearum* in latently infected potato tubers and soil by post-enrichment ELISA. CIP Program Report 1997-98, p:11-121. International Potato Center. Lima (Perú).

PRIOU, S., L. GUTARRA, H. FERNANDEZ & P. ALEY, 1999d. Sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* (race 3) in soil by post-enrichment DAS-ELISA. ACIAR Bacterial Wilt Newsletter 16: 10-13.

PRIOU, S. 2001. Kit ELISA-NCM para la detección de *R. solanacearum* en papa. Centro Internacional de la Papa (CIP).

PRIOU, S., R. TORRES, A. VILLAR, L. GUTARRA AND F. DE MENDIBURU. 2001a. Optimization of sample size for the detection of latent infection by *Ralstonia solanacearum* in potato seed tubers in the highlands of Peru. *Potato Research* 44: 349-358.

PRIOU, S., C. SALAS, F. DE MENDIBURU, L. GUTARRA & P. ALEY, 2002. Assessment of latent infection frequency in progeny tubers of advanced potato clones resistant to bacterial wilt: A new selection criterion. *Potato Research* 44.

PRIOU, S., 2004a. Manual of instructions for use. DAS-ELISA kit for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato stems. 16 pp. (in English and Spanish), International Potato Center (CIP), Lima, Perú.

PRIOU, S., 2004b. Integrated management of bacterial wilt and soil-borne diseases of potato in farmer communities of the inter-Andean valleys of Perú and Bolivia. Final Technical Report DFID CRF 7862©. 68 Pages.

PRIOU, S., L. GUTARRA AND P. ALEY (2005) An improved enrichment broth for the sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* (biovars 1 and 2A) in soil using DAS-ELISA. *Plant Pathology* 55(1):36-45.

ROBINSON-SMITH, A., JONES, P., ELPHINSTONE, J. G., AND FORDE, S. M. D. 1995. Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causal agent of bacterial wilt. *Food and Agriculture Immunology* 7:67-79.

ROWE, P.R. & L. SEQUEIRA .1970. Inheritance of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in *Solanum phureja*.Phytopathology 60: 1499-1501

ROWE, P.R., L. SEQUEIRA AND L.C. GONZALES, 1972. Additionnal genes for resistance to *Pseudomonas solanacearum* in *Solanum phureja*.Phytopathology 62: 1092-1093.

SCHMIEDICHE, P. 1984. Resistencia genética: Fuentes y Mejoramiento genético. En: Marchitez Bacteriana de la papa (*Pseudomonas solanacearum*) en América Latina. Centro Internacional de la Papa. pp 91-95.

SCHMIEDICHE, P.1985. Breeding Potatoes for Resistance to Bacterial Wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. En ACIAR Proceedings Nro 13, pp 105-111 (ed. Persley, G.J.), Camberra, Australia.

SCHMIEDICHE, P.1988. Breeding for resistance to *Pseudomonas solanacearum*.In: Bacterial Disease of the Potato. Report of the Planning Conference on Bacterial Diseases of the Potato 1987.Centro Internacional de la Papa. Lima, Peru. pp 19-27.

SCHMIEDICHE P. 1992. CIP Reseach Guide 27.International Potato Center. 7 pp.

SEAL, 1995. PCR-based detection and characterization of *Pseudomonas solanacearum* for use in less developed countries.Bulletin OEPP/EPPO.Bulletin 25, 227-271.

SENASA. 1999. Results of a survey on potato diseases in Perú in 1998-1999.

SEQUEIRA, L., & P. R. ROWE. 1969. Selection and utilization of *S. phureja* clones with high levels of resistance to different strains of *Pseudomonas solanacearum*. American Potato Journal 45:51-55.

SEQUEIRA, L. 1979. Development of resistance to Bacterial Wilt derived of *Solanum phureja*. En: Developments in control of bacterial potato diseases. Report of Planning Conference. Centro Internacional de la Papa. pp:55-62.

SHEKHAWAT, G.S., R. SINGH, B.R. TYAGI & P.C. MISRA. 1980. Resistance to Bacterial Wilt in diploid *Solanum microdontum* Butt. J. Indian Potato Assoc. 7:119-124.

SMITH, E.F. 1896. A bacterial disease of the tomato, eggplant and Irish potato (*Bacillus solanacearum* n. sp.). Bulletin, Division of Vegetable Physiology and Pathology, United States Department of Agriculture, 12, 1-28.

SMITH, H. G. & BARKER, H. 1999. The Luteoviridae. CAB International, Wallingford, UK, 320 pp.

SPOONER, D.M. & R. HIJMANS. 2001. Potato Systematics and Germplasm Collecting, 1989-2000. Amer J of Potato Res 78: 237-268.

SPOONER, D.M., R.G. VAN DE BERG, A. RODRIGUEZ, J. BAMBERG, R. HIJMANS & S.I. LARA CABRERA, 2004. Wild potatoes (*Solanum* Section *Petota*: Solanaceae) of North and Central America. USA. American Society of Plant Taxonomists. 1. 209 pp. Systematic Botany Monographs. V. 68.

SUSLOW, T., M. SCHROTH, and M. ISAKA. 1982. Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* 72:917-918.

TARR, S.A.J. 1972. The principles of Plant Pathology. London (UK). Macmillan. 632 pp.

THURSTON, D. & C. LOZANO. 1968. Resistance to bacterial wilt of potatoes in Colombian clones of *Solanum phureja*. *Amer Potato J.* 45:51-55

THUNG, T.H., 1947. Potato Diseases and Hybridization. *Phytopathology* 37, 373-81.

THUNG, P.X., E.T. JR. RASCO, P. VANDER ZAAG, & P. SCHMIEDICHE. 1990. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in the Potato: I. Effects of source of resistance and adaptation. *Euphytica* 45:203-210.

TORRES, E., 1984. Situación actual de las Investigaciones sobre la Marchitez Bacteriana de la Papa en el Perú. En: Marchitez Bacteriana de la Papa (*Pseudomonas solanacearum*) en América Latina. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú.

UNIVERSITY OF WISCONSIN. 1986. Inventory of Tuber-bearing *Solanum* species Research División, College of Agricultural and Life Sciences .Madison, Wisconsin. Cooperating with U.S. Department of Agriculture and State Agricultural Experiment Stations throughout the United States. Bulletin 533. 205 pp.

VALDEZ, R. (1986). Bacterial wilt in the Philippines. In: Persley G. (ed) 1986. Bacterial wilt disease in Asia and South Pacific. *Proceeding of International Workshop of PCARRD*, Los Baños, Philippines, 8-10 October 1985. *ACIAR Proceedings*, 13, 49-56.

WILKINSON, M. J., DONNELLY, A. & I. BLACK. 1994. The Commonwealth Potato Collection. Inventory for 1994. Scottish Crop Research Institute Dundee, DD2 5DA.

www.senasa.gob.pe

YABUUCHI, E. KOSATO, Y., YANO, I., HOTTA, H. NISHIUCHI, Y. 1995. Transfer of Two *Burkholderia* and *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleronii and Douderoff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1986) comb.nov.and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. Microbiology and Immunology 39, 897-904.

ZALEWSKY, J.C. & L. SEQUEIRA. 1975. An antibacterial compound from *Solanum phureja* and its role in resistance to bacterian wilt. Phytopathology 65:1336-1341.

X. ANEXOS

10.1. Lista de especies de *Solanum* con sus acrónimos (Spooner & Hijmans, 2001)

Especie	Acr
<i>Solanum acaule</i>	acl
<i>Solanum acaule</i> subsp. <i>acaule</i> f. <i>incuyo</i>	inc
<i>Solanum acroglossum</i>	acg
<i>Solanum acroscopicum</i>	acs
<i>Solanum alandiae</i>	aln
<i>Solanum albicans</i>	alb
<i>Solanum amayanum</i>	amy
<i>Solanum ambosinum</i>	amb
<i>Solanum ancophilum</i>	acp
<i>Solanum avilesii</i>	avl
<i>Solanum berthaultii</i>	ber
<i>Solanum bill-hookerii</i>	bhk
<i>Solanum boliviense</i>	blv
<i>Solanum boliviense</i> subsp. <i>astleyi</i>	ast
<i>Solanum brevicaule</i>	brc
<i>Solanum buesii</i>	bue
<i>Solanum bukasovii</i>	buk
<i>Solanum bukasovii</i> f. <i>multidissectum</i>	mlt
<i>Solanum bulbocastanum</i>	blb
<i>Solanum cajamarquense</i>	cjm
<i>Solanum candolleanum</i>	cnd
<i>Solanum cantense</i>	cnt
<i>Solanum chacoense</i>	chc
<i>Solanum chancayense</i>	chn
<i>Solanum chilliasense</i>	chl
<i>Solanum chillonanum</i>	chi
<i>Solanum chiquidenum</i>	chq
<i>Solanum chiquidenum</i> var. <i>gracile</i>	gra
<i>Solanum chomatophilum</i>	chm
<i>Solanum chomatophilum</i> var. <i>subnivale</i>	sbn
<i>Solanum circaeifolium</i>	crc
<i>Solanum circaeifolium</i> var. <i>capsicibaccatum</i>	cap
<i>Solanum coelestipetalum</i>	cop
<i>Solanum commersonii</i>	cmm
<i>Solanum demissum</i>	dms
<i>Solanum dolichocremastrum</i>	dcm
<i>Solanum flahaultii</i>	flh
<i>Solanum gandarillasii</i>	gnd
<i>Solanum gracilifrons</i>	grc
<i>Solanum guzmanguense</i>	gzm
<i>Solanum hastiforme</i>	hst
<i>Solanum hoopesii</i>	hps
<i>Solanum hougasii</i>	hou
<i>Solanum huancabambense</i>	hcb
<i>Solanum huancavelicae</i>	hcv
<i>Solanum huarochiriense</i>	hro
<i>Solanum hypacrarthrum</i>	hcr

Anexo 10.1 (continuación)

Especie	Acr
<i>Solanum incamayoense</i>	inm
<i>Solanum incasium</i>	ins
<i>Solanum infundibuliforme</i>	ifd
<i>Solanum iopetalum</i>	iop
<i>Solanum irosinum</i>	irs
<i>Solanum jalcae</i>	jlc
<i>Solanum jamesii</i>	jam
<i>Solanum laxissimum</i>	lxs
<i>Solanum leptophyes</i>	lph
<i>Solanum lignicaule</i>	lgl
<i>Solanum limbaniense</i>	lmb
<i>Solanum maglia</i>	mag
<i>Solanum marinasense</i>	mrn
<i>Solanum medians</i>	med
<i>Solanum medians</i> var. <i>autumnale</i>	aut
<i>Solanum megistacrolobum</i>	mga
<i>Solanum megistacrolobum</i> subsp. <i>megistacrolobum</i> f. <i>purpureum</i>	prp
<i>Solanum megistacrolobum</i> subsp. <i>toralapanum</i>	tor
<i>Solanum microdontum</i>	mcd
<i>Solanum multiinterruptum</i>	mtp
<i>Solanum multiinterruptum</i> var. <i>machaytambinum</i>	mac
<i>Solanum okadae</i>	oka
<i>Solanum oplocense</i>	opl
<i>Solanum orophilum</i>	orp
<i>Solanum pampasense</i>	pam
<i>Solanum paucisectum</i>	pcs
<i>Solanum peloquinianum</i>	plq
<i>Solanum pillahuatense</i>	pll
<i>Solanum pinnatisectum</i>	pnt
<i>Solanum piurae</i>	pur
<i>Solanum polyadenium</i>	pld
<i>Solanum raphanifolium</i>	rap
<i>Solanum raquialatum</i>	raq
<i>Solanum sandemanii</i>	snd
<i>Solanum santolallae</i>	san
<i>Solanum sawyeri</i>	swy
<i>Solanum scabrifolium</i>	scb
<i>Solanum schenkii</i>	snk
<i>Solanum simplicissimum</i>	smg
<i>Solanum sogarandinum</i>	sgr
<i>Solanum sparsipilum</i>	spl
<i>Solanum spgazzinii</i>	spg
<i>Solanum stenophylidium</i>	sph
<i>Solanum stoloniferum</i>	sto
<i>Solanum sucrense</i>	scr
<i>Solanum tacnaense</i>	tcn
<i>Solanum tarapatanum</i>	trp
<i>Solanum tarijense</i>	tar
<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i>	adg
<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i> var. <i>arakka</i>	ark

Anexo 10.1 (continuación)

Especie	Acr
<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i> var. <i>paramoense</i>	prm
<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i> var. <i>yanacochense</i>	yan
<i>Solanum tuquerrense</i>	tuq
<i>Solanum ugentii</i>	ugt
<i>Solanum urubambae</i>	uru
<i>Solanum urubambae</i> f. <i>velutinum</i>	vel
<i>Solanum velardei</i>	vlr
<i>Solanum vernei</i>	vrn
<i>Solanum vernei</i> subsp. <i>ballsii</i>	bal
<i>Solanum verrucosum</i>	ver
<i>Solanum vidaurrei</i>	vid
<i>Solanum violaceimarmoratum</i>	vio
<i>Solanum wittmackii</i>	wtm
<i>Solanum xblanco-galdosii</i>	blg
<i>Solanum xdoddsii</i>	dds
<i>Solanum yungasense</i>	yun

10.2. Medio diferencial de *Ralstonia solanacearum* Kelman (French *et al.*, 1995)

El medio de Kelman (Kelman, 1954) fue modificado por la adición de 2.5 g de dextrosa para favorecer el crecimiento del Biovar 2A-Raza 3 de *Ralstonia solanacearum* (French *et al.*, 1995). Este medio es útil para distinguir a *R. solanaceum* de otras bacterias durante el aislamiento.

- **Solución stock de 2, 3,5 triphenil tetrazolium chloride (TZC):**

Disolver 1 g de TZC en 100 ml de agua destilada, colocarlo en una botella hermética de color oscuro y autoclavar por sólo 8 minutos o esterilizar por filtración. Almacenar refrigerado.

- **Medio Basal**

Dextrosa	2.5 g
Peptona	10 g
Casaminoácidos (Difco)	1 g
Bacto agar (Difco)	16 g
Agua destilada	1000 ml

10.3. Caldo de enriquecimiento SMSA

- **Medio Basal**

Glicerol	10 ml
Peptona	10 g
Casaminoácidos (Difco)	1 g
Agua destilada	1000 ml

Esterilizar por 15 minutos a 121° C y enfriar a 50°C para añadir los antibióticos previamente esterilizados por filtración (la concentración final de cada producto se encuentra entre paréntesis):

- 10 ml de Sulfato de Polimixina al 1% (100 mg/L).
- 500 µl de Cristal Violeta al 1% (5mg/L).*
- ml de Cloruro de Trifenil Tetrazolio 2,3,5 al 1% (TZC-50mg/L).*
- 2.5 de Bacitracina al 1% (25 mg/L).
- 500 µl de Penicilina G al 0.1% (0.5 mg/L).
- 500 µl de Cloramfenicol al 1% (5 mg/L).**
- 10 ml de cicloheximida al 1% (100 mg/L).
- Autoclavar a 121° C c 8 minutos.

**Antibiótico que se disuelve con alcohol.

10.4. Prueba de inmunoenzimática del tipo sándwich de doble anticuerpo (ELISA-DAS)

- **Buffer de cobertura pH 9.6**

- **Buffer carbonato 50 mM**

Na ₂ CO ₃	1.59 g
NaHCO ₃	2.93 g
NaN ₃ (3 mM)	0.195 g

- **Buffer Fosfato Salino – PBS 10 mM pH 7.4 (con azida de sodio)**

- **Buffer Fosfato Salino 10 mM**

KH_2PO_4	0.2 g
Na_2HPO_4	1.15 g
NaCl (137 mM)	8.0 g
KCl (2.7 mM)	0.2 g
NaN_3 (3 mM)	0.195 g

- **Buffer de lavado – PBS Tween pH 7.4**

PBS	1000 ml
Tween 20	0.5 ml

- **Buffer de conjugado pH 7.4**

PBS – Tween	100 ml
PVP – 40	2 g
Leche en polvo sin grasa	0.2 g

- **Buffer de sustrato pH 9.8**

Dietanolamina	11.64 ml
Agua Bidestilada	6.76 ml
HCl 37%	1.6 ml
p – NNP* (5 mg)	1 tableta por cada 10 ml

*p – NNP: para nitrofenil fosfato.

10.5. Prueba de inmunoenzimática en membrana de nitrocelulosa (ELISA-NCM)

- **Buffer Fosfato Salino-PBS 10mM pH 7.4 (con azida de sodio)**

- **Buffer Fosfato Salino 10mM**

KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
NaCl (137mM)	8.0 g
KCl (2.7mM)	0.2 g
NaN ₃ (3mM)	0.195 g

- **Tampón TBS pH 7.5 (1000ml)**

0.02M Tris	2.42 g
0.5M NaCl	29.22 g
0.01% NaN ₃	0.10 g
HCl 18.5%	6 ml

- **Buffer de Lavado –T-TBS (500ml)**

Tween 20	250ul
TBS	500ml

- **Solución de bloqueo (30ml)**

Leche en polvo sin grasa	0.43 g
TBS	30 ml

- **Tampón Sustrato pH 9.6 (1000ml)**

0.1M Tris	12.1 g
0.1M NaCl	5.8 g
5mM MgCl ₂ 6H ₂ O	10 g
H ₂ O destilada	1000 g

Agregar algunas gotas de HCl hasta alcanzar el pH. Deseado

- **Solución Sustrato**

Soluciones Nitroblue tetrazolio (NBT), Sal de Toluidina de 5 bromo, 4-cloro, 3- indolil (BCIP)

NBT 30 mg

BCIP	15 mg
------	-------

Las soluciones NBT y BCIP a 4°C (no más de un mes).

- **Disolventes:** Dimetil formamina (DMF)

DMF/NBT= 70% DMF en agua 1.0 ml

DMF/BCIP= 100% DMF 1.0 ml

Disolver el contenido de la solución de NBT añadiendo 800ul del disolvente DMF/NBT, agitar hasta disolver completamente, lo mismo para BCIP.

- **Solución reveladora**

Solución sustrato	25 ml
-------------------	-------

Solución NBT	100 μ l
--------------	-------------

Solución BCIP	100ul
---------------	-------